

DIE ENZYMAUSSTATTUNG DER LYSOSOMEN
AUS DER GLANDULA SUBMANDIBULARIS
DES MENSCHEN UND DER RATTE

S. HADDAD

—

1975

AUS DER HALS-, NASEN-, OHREN-KLINIK UND POLIKLINIK DER
UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Prof. Dr. H. Naumann

DIE ENZYMAUSSTATTUNG DER LYSOSOMEN
AUS DER GLANDULA SUBMANDIBULARIS
DES MENSCHEN UND DER RATTE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilian-Universität zu München

vorgelegt von
S. H a d d a d
aus Kab Elias, Libanon

München 1975



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter Priv. Dozent Dr. K. Hochstrasser
Prof. Dr. H. Naumann

Mitberichterstatter Prof. Dr. H. Fritz

Dekan Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung 22. Juli 1975

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG

1. Entdeckung und Geschichte der Lysosomen
2. Physiologische Funktion
3. Rolle in der Pathophysiologie
4. Die lysosomalen Enzyme
5. Übersicht über die bisher untersuchten Gewebearten

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Versuche zur Anreicherung
2. Methode zur Isolierung
3. Methoden zum Nachweis der einzelnen Enzyme

III. ERGEBNISSE

1. Eigene Untersuchungen
2. pH-Optimum und Michaelis-Konstante
3. Enzymmuster beim Menschen
4. Enzymmuster bei der Ratte
5. Eigenschaften der einzelnen Enzyme

IV. ZUSAMMENFASSUNG

V. LITERATUR

I. 1. Entdeckung und Geschichte der Lysosomen

Die Lysosomen wurden von de Duve im Jahre 1949 entdeckt. Ihre Entdeckung erfolgte zufällig bei Versuchen über den Effekt von Insulin auf das isolierte Lebergewebe.

Bei der fraktionierten Ultrazentrifugation von Leberorganellen fand de Duve in einer bestimmten Fraktion saure Phosphatase. Er schloß aus diesem Ergebnis, daß das Enzym an subcelluläre Strukturen gebunden sein muß. Aufgrund von Untersuchungen mit dem Elektronenmikroskop konnte diese saure Phosphatase in subcellulären Granula nachgewiesen werden, die eine sackförmige Struktur besitzen und von einer Membran umhüllt sind. Diese Gebilde werden als Lysosomen bezeichnet.

Zu ähnlichen Ergebnissen gelangten etwa gleichzeitig Novikoff et al. (1953) und Walker (1952).

Baufay et al (1957) konnte zeigen, daß lysosomenähnliche Partikel auch in anderen Geweben als in der Leber enthalten sind.

Strauß veröffentlichte 1954 ähnliche Beobachtungen über untersuchte Zellgewebe der Nierentubuli, die jedoch den beschriebenen Arbeiten von de Duve ähnlich waren.

In der Folge wurde man sich mehr und mehr der Bedeutsamkeit der Lysosomen bewußt. 1960 und 1963 erschienen mehrere Arbeiten von Cohn und Wiener, die zu der Ansicht führten, daß die Lysosomen endocelluläre Vakuolen darstellen, die Verdauungsenzyme enthalten. Im Februar 1963 fand die erste Konferenz über die Lysosomen bei der Ciba-Foundation statt. Danach wurde die Rolle der Lysosomen in der Physiologie und in der Pathophysiologie ausführlich diskutiert. Die Enzymausstattung der Lysosomen aus der Glandula submandibularis des Menschen und der Ratte wurde erstmals von K. Hochstraßer und S. Haddad 1972 untersucht.

I. 2. Physiologische Funktion

Bei jeder Zellschädigung tritt eine übermäßige Steigerung der körpereigenen Abbauprozesse, verbunden mit einer Zunahme der autophagischen oder heterophagischen Vorgänge, auf.

Lysosomen sind nicht, wie anfänglich vermutet, "Selbstmordpäckchen" der Zelle aufgrund ihres gewebe- und zellauflösenden Inhalts; sie sind vielmehr "Überlebenspäckchen, durch die es der Zelle möglich ist, sich an eine Zellschädigung anzupassen. Der Zelltod selbst betrifft in den meisten Fällen erst sekundär das lysosomale Abbau-system, während er primär die auf Leistung und Energie ausgerichteten Organellen betrifft.

De Duve gliedert in seinem "Lysosomenkonzept" die lysosomale Tätigkeit in

- a) die prälysosomale Phase,
- b) die lysosomale Phase, sowie
- c) die postlysosomale Phase.

a) Prälysosomale Phase

Sie umfaßt die primären Lysosomen, die Phagosomen und die Autophagievakuolen.

Primäre Lysosomen sind Vesikel, die, umhüllt von einer Membran, eine elektronendichte, homogene Matrix enthalten und noch nicht am extra- und intrazellulären Abbauprozess beteiligt waren.

Primäre Lysosomen entstehen aus einem Membrankomplex, der GERL-Komplex bezeichnet wird (Novikoff) und auf der Achse RER-Golgi-Apparat liegt. Im RER werden die lysosomalen Abbauenzyme synthetisiert, gelangen in den RER Transportvesikeln zum Golgi-Apparat und werden dort in Golgi-Vesikel umgewandelt und kondensiert, um ihn als primäre Lysosomen zu verlassen. Anschließend verschmelzen sie entweder mit sekundären Lysosomen oder mit der Zellmembran und entleeren ihren Inhalt über eine Exozytose in den Extrazellulärraum. So können die lysosomalen Hydrolasen auch zelleextern, z.B. beim Abbau der Bindegewebsmatrix wirksam

werden. Hier werden zuerst Grundsubstanz und kollagene Fasern proteolytisch angedaut, um dann in die Zelle aufgenommen und dort vollständig abgebaut zu werden (= Zweitschrittverdauung der bindegewebigen Grundsubstanz).

Ein Kontakt lysosomaler Abbaufemente mit extralysosomal gelegenen Substraten ist nur möglich, wenn die Lysosomenmembran physikalisch-chemisch so verändert wird, daß sie für die Lysosomenenzyme transparent geworden ist. Daraus ist zu folgern, daß ihr eine Schlüsselstellung in der Lysosomenfunktion zukommt.

Lysosomenlabilisatoren, wie z.B. die fettlöslichen Vitamine A, D und K begünstigen diesen Vorgang. Eine Verschmelzung primärer Lysosomen mit den Vakuolen wird ebenfalls durch die Labilisierung ermöglicht.

Lysosomenstabilisatoren dagegen sind Substanzen, die die Freisetzung lysosomaler Hydrolasen und somit die Fusions-eigenschaften der Lysosomen hemmen. Dazu gehört das Kortison.

b) Lysosomale Phase

Heterophagie und Autophagie sind die Hauptmechanismen, durch die Verdauungsenzyme und Substrate des lysosomalen Abbaus zusammentreffen.

In einer Endozytose werden exogene Objekte wie Bakterien bei der Heterophagie in die Zelle aufgenommen. Dabei stülpt sich die Zellmembran ein, bis das exogene Objekt in einem Phagosom zu liegen kommt. Die Verschmelzung eines Phagosoms mit einem primären oder auch einem sekundären Lysosom in der lysosomalen Phase ermöglicht den Abbau des Inhalts des Phagosoms durch lysosomale Verdauungsenzyme, und dadurch die Umwandlung des Phagosoms in ein Phagolysosom.

Im Fall der Nephrose oder Glomerulonephritis mit nephrotischem Einschlag, bei der Bluteiweißkörper aus dem Lumen der proximalen Nierentubuli in die Zelle aufgenommen werden, ist die Aufnahme und Verdauung von Fremdstoffen am besten untersucht. Großmolekulare Stoffe wie Zucker oder kolliodale Blutersatzmittel werden ebenfalls lysosomal gespeichert. Beim Schock werden von Zellen des RES Gerinnungsprodukte und Fibrinbruchstücke phagozytiert.

Die Beseitigung funktionslos gewordenen Zellen- und Gewebematerials stellt eine der wichtigsten Aufgaben der Lysosomen in Phagozyten dar. In der Reinigungsphase der Wundheilung werden Histiozyten beseitigt. Durch die heterophagische Aktivität der Phagozyten werden Thromben resorbiert. Fibrinöse Beläge, an den Körperhöhlen im Verlaufe von Entzündungen entstanden, werden durch diesen Vorgang "organisiert".

Auch die fibrinoiden Nekrosen des Bindegewebes bei rheumatischem Fieber, bestehend aus Fibrin und nekrotischen Kollagenfasern, werden durch spezielle Histiozyten phagozytiert. Dabei tritt auch die Zweitschrittverdauung der bindegewebigen Grundsubstanz in Aktion.

Viele Fremdstoffe können nicht lysosomal abgebaut, jedoch phagozytiert werden, wie die meisten exogenen, nicht im Organismus entstandenen Pigmente (Tätowierung, Schwermetall Blei). Diese exogenen Pigmente bleiben in den Phagozyten und somit auch im Gewebe liegen, wie auch das Amyloid. Andererseits kann der Blutfarbstoff von Histiozyten phagozytiert und in bräunliche, eisenhaltige Pigmentkörnchen (Hämosiderin) umgewandelt werden. Dies tritt besonders bei Blutungen mit lokaler Hämosiderinablagerung in den Organen des RES, der Leber und der Niere als Hämosiderose in Erscheinung. Durch die lysosomale Tätigkeit erfolgt auch eine Regulierung des Depoteisens, des Ferritins. Das Ferritin erweist sich gegenüber lysosomalen Enzymen als sehr widerstandsfähig und häuft sich in den Lysosomen an, wo es gegebenenfalls mit Zelltrümmern zu Hämosiderin kondensiert wird. Bei vermehrtem Eisenbedarf erfolgt eine lysosomale Trennung des Eisens vom Ferritin und eine Einschleusung in den Blutstrom

Ähnlich wie das Eisen wird auch das Kupfer nach seiner Resorption im Serum an ein Transportprotein (Zöruloplasmin) gebunden. Es gelangt in ionisierter Form in die Zellen, wo es die mitochondrialen Atmungsprozesse hemmt. Eine Konzentration in den Lysosomen erfolgt in einer bereits physiologischerweise wirksamen Schutzmaßnahme. Indem es von einem gewissen Konzentrationsgrad an eine Oxydation der Membranlipide bewirkt, zerstört das Kupfer jedoch auch die

Lysosomenmembran. Die lysosomalen Hydrolasen gelangen danach ins Zytoplasma und leiten den Zelltod ein. Durch eine Anhäufung des Kupfers in den Ganglienzellen verschiedener Hirnkerne (Hepatolentikuläre Degeneration) führt es zu schweren Störungen des extrapyramidalen Systems.

Von Granulozyten, Histozyten und Zellen des RES werden auch Bakterien phagozytiert.

Die Lysosomen spielen auch eine Rolle bei der experimentellen Teratogenese.

Die Mitwirkung lysosomaler Enzyme wird auch bei der Ausbreitung von Tumorzellen postuliert. An der Zelloberfläche freigesetzte lysosomale Fermente sollen die Loslösung der Tumorzellen aus dem Verband ermöglichen. Die Invasion maligner Tumorzellen in die Gewebe wird durch die lysosomale Zerstörung der Zellen und der Intrazellulärsubstanz ermöglicht.

Bei der Autophagie werden geschädigte oder funktionslos gewordene Zellbestandteile abgebaut. Sie stellt einen Vorgang dar, der permanent den Umbau der zellulären Komponenten gewährleistet, da alle Zellorganellen nur eine begrenzte Lebensdauer haben. Das Ergastoplasma steuert den Ablauf der Autophagie, indem sich RER-Schläuche zirkulär um den abzubauenen Zytoplasmabereich legen, bis er von einer doppelwandigen Autophagievakuole umschlossen und so vom übrigen Zytoplasma isoliert ist. Zwischen den beiden Membranen läßt sich bereits zu diesem Zeitpunkt das lysosomale Leitenzym saure Phosphatase nachweisen, das unter Auflösung der inneren Vakuolenmembran in das Innere der Vakuolen diffundiert. Damit hat sich ein Zytolysosom gebildet und gleichzeitig die lysosomale Phase begonnen.

Die Autophagie stellt einen energiefordernden Prozeß dar, der nicht von der Proteinsynthese abhängt. Bei Mangel an bestimmten Aminosäuren oder auch bei Hunger treten vermehrte Autolysosomen auf, deren Abbauprodukte dem Energiereservoir wieder zugeführt werden. Der Körper zehrt also an zelleigenen Substanzen und frißt sich somit selbst auf. Bei physiologischer Involution, z. B. bei der Altersatrophie von Geweben (Leber, Gehirn, Herz), Atrophie der Mamma-

drüsen nach Laktation, Atrophie der Geschlechtsorgane und dem Menstrualzyklus der Uterusschleimhaut sind autophagische Prozesse besonders ausgeprägt.

Lysosomale Enzyme sind ferner in der frühen Embryonalentwicklung bei der Nidation des befruchteten Eies für den Gewebsabbau verantwortlich.

c) Postlysosomale Phase

Nachdem der Abbauprozess des intravakuolären Materials abgeschlossen ist, können die von der Heterophagie stammenden Phagolysosomen sowie die von der Autophagie herrührenden Zytolysosomen in der postlysosomalen Phase entweder als Telolysosomen bzw. Restkörper in der Zelle verweilen oder über die Exozytose aus der Zelle ausgeschieden werden.

Myelinartige Körper und tröpfchenförmige Fettpigmente charakterisieren die Restkörper morphologisch (Lipofuszin). Die Tatsache, daß solche fetthaltigen "Verdauungsreste" in den Telolysosomen zurückbleiben, beruht vermutlich darauf, daß die Lysosomen eine maximale Aufnahmekapazität speziell für Fett haben. Die Aktivität der lysosomalen Enzyme, insbesondere der sauren Phosphatase und der Esterase nimmt ab, sobald diese überschritten ist.

I. 3. Rolle in der Pathophysiologie

Durch eine gestörte Funktion des lysosomalen Systems kann eine große Zahl von Erkrankungen erklärt werden. Dabei lassen sich folgende pathogenetische Mechanismen (zum Teil noch Arbeitshypothese) von einander abgrenzen:

a) Zellschädigung durch abnorme Membranstabilität (= Fusionsschwäche der Lysosomen)

Durch einen Mangel an Vitamin A oder D sowie durch die Verabreichung von Kortison läßt sich experimentell diese Lysosomenveränderung hervorrufen. Eine verzögerte Bildung der sekundären lysosomalen Funktionsformen (Autophagie und Heterophagie) ist die Folge davon.

Beim Chediak-Higashi-Syndrom liegt ein Gendefekt vor, bei dem die Phagolysosomenbildung reduziert ist. Schließlich besteht noch ein partieller Albinismus mit ausgeprägter Lichtempfindlichkeit, der auf einer gestörten Aufnahme der Melanosomen in die Keratinozyten beruht.

Auch bei der progressiv septischen Granulomatose ist die Phagolysosomenbildung gestört. Die Granulozyten der erkrankten Kinder können zwar Bakterien phagozytieren, jedoch wegen der lysosomalen Funktionsschwäche nicht proteolytisch abbauen.

Der Vitamin-D-Mangelrachitis liegt auch eine verzögerte Freisetzung lysosomaler Proteasen zugrunde; die Infektabwehr ist reduziert. Wegen der gestörten chondrozytären Chondrolyse bleibt der Knorpelabbau im Bereich der Epiphysenfuge aus, das Skelettwachstum wird entsprechend verlangsamt.

Bei der Kortisontherapie wird zwar die Lysosomenmembran vor einer überstürzten Ruptur geschützt, als Nebeneffekt werden aber die Phagozytose von Bakterien und Pilzsporen und ihre lysosomale Verdauung erschwert, weshalb bei einer Kortisonbehandlung eine große Sepsisgefahr besteht.

b) Zellschädigung durch abnorme Membranlabilität und Ruptur der Lysosomenmembran

Eine derartige Zellschädigung läßt sich, z.B. durch lichtempfindliche Substanzen, die in den Lysosomen angereichert

werden, experimentell auslösen. Sie bringen die Lysosomenmembran nach der Lichtexposition durch eine Photooxydation zum Bersten und lösen den Zelltod aus. Auch die Vitamine A und D sowie die UV-Bestrahlung labilisieren die Lysosomenmembran. Denselben Effekt haben ferner auch Staphylokokken, Bakterien Endotoxine, hyperbarer Sauerstoff und heterogene Antikörper mit Komplement.

Bei vielen Krankheitsbildern wird eine vermehrte Freisetzung lysosomaler Enzyme durch Labilisierung der Lysosomenmembran beschrieben. Im Falle einer akuten Entzündungsreaktion werden die Enzyme freigesetzt und scheinen für die erhöhte Kapillarpermeabilität verantwortlich zu sein. Auf diese Weise können die lysosomalen Hydrolasen auch außerhalb der Zelle wirksam werden und den proteolytischen Abbau der Umgebung leiten.

Auch an der Pathogenese verschiedener Autoimmunkrankheiten ist die Schädigung der Lysosomenmembran beteiligt, so z.B. bei der primär-chronischen Polyarthrititis und beim Lupus erythematodes. Die entzündliche Gewebeerstörung wird durch Freisetzung lysosomaler Abbauprodukte in den Zellsaft oder in die unmittelbare Umgebung der Zelle infolge einer Lysosomenmembranruptur eingeleitet. Dabei entstehen durch folgende drei Mechanismen (experimentell bewiesen) abnorme Bruchstücke normaler Zell- oder Bindegewebsbestandteile, die vom Organismus nicht mehr als zu ihm gehörig anerkannt werden:

1. Die hochmolekularen Zellteile werden phagozytiert und in Phagolysosomen hydrolytisch aufgespalten. Das "bearbeitete" antigen wirkende Material gelangt schließlich zu den antikörperbildenden Lymphozyten.
2. Durch wiederholte Exposition exogener Toxine oder infolge eines angeborenen Defektes fehlen bestimmte lysosomale Abbauenzyme. Der Abbau der phagozytierten Zellteile läuft unvollständig ab und bleibt auf der Stufe autoantigener Fragmente stehen.

3. Intrazelluläres Verweilen verschiedener Mikroorganismen stimuliert übermäßig die Phagolysosomenbildung. Folge davon ist ein beschleunigter Zweitschrittabbau des Bindegewebes, wodurch ein relativer Mangel an lysosomalen Enzymen mit einem entsprechend unvollständigen Abbau der autoantigenen Gewebefragmente entsteht. (Sandritter)

Ohne, daß bei diesem Vorgang die Phagozyten selbst Schaden nehmen, wird eine große Zahl von Fremdkörpern phagozytiert. Daneben gibt es aber auch Substanzen wie Quarz-, Oxyalat- oder Harnsäurekristalle, die die Phagolysosomenmembran schädigen (Gicht).

Neben diesem phagogenetischen Mechanismus, bei dem die lysosomalen Enzyme durch die Membranruptur der Lysosomen selbst freigesetzt werden, so daß der Zelltod eintritt, gibt es auch einen pathogenetischen Vorgang, bei dem der Zelltod durch irreversible Schädigung der Zellmembran eingeleitet wird. Der Zellinhalt läuft einschließlich Lysosomen aus; es beginnt der lysosomale Abbau des umliegenden Gewebes.

Auch während des Phagozytosevorganges können lysosomale Enzyme in die extrazelluläre Umgebung entweichen. Die Zelle polarisiert sich und streckt an ein oder zwei Polen mehrere phagozytierende Tentakel aus, um die an der Zelloberfläche anhaftenden Immunpräzipitate zu verschlingen, sobald polymorphkernige Granulozyten mit Antigen-Antikörper-Komplexen in Kontakt kommen. Die dadurch entstandenen, nach außen noch offenen Phagosomen verschmelzen mit den primären Lysosomen, so daß lysosomale Enzyme an die Zelloberfläche entweichen können. Durch Aggregation eines Mikrotubulsystems werden die Leukozytengranula (= primäre Lysosomen) in Bewegung gesetzt. Der intrazelluläre c-AMP (= zyklisches Adenosinmonophosphat) kontrolliert diese Mikrotubuli in ihrer Funktion, indem c-AMP die Aktion der Mikrotubuli bremst und so die Freisetzung lysosomaler Hydrolasen verhindert, während das c-AMP seinerseits durch Prostaglandine stimuliert wird.

c) Zellschädigung durch Mangel an lysosomalen Enzymen

Bei einer Reihe von Krankheitsbildern stauen sich infolge eines Mangels an bestimmten lysosomalen Enzymen im Zytoplasma verschiedene Stoffwechselprodukte an. Die Überladung der Lysosomen geht schließlich so weit, daß entweder die Organellen des Leistungs- und Energiestoffwechsels verdrängt werden und die Zellfunktion erlischt, oder daß die Lysosomenmembranen platzen und ihren zellschädigenden Inhalt ins Zytoplasma oder in das umgebende Gewebe entleeren. Bei diesen Krankheitsbildern beruht der Mangel an lysosomalen Enzymen auf einem Gendefekt. Die Lebenserwartung der betroffenen Kinder ist gering.

In die Gruppe der Glykogenspeicherkrankheiten (= Typ II) gehört die Pompesche Krankheit. Sie ist auf einen Mangel an α -1, -4-Glukosidase (= Maltase) in den Lysosomen zurückzuführen. Obwohl es über den normalen Weg der Glykogens segregation autophagozytiert wird, kann das Glykogen wegen des Enzymdefektes in den Lysosomen nicht abgebaut werden (Leber, Myokard, Skelettmuskulatur).

Bei den Mukopolysaccharidosen handelt es sich um eine Gruppe von Krankheiten, bei denen lysosomale Enzyme fehlen oder mangelhaft vorhanden sind, die am Abbau der Mukopolysaccharide beteiligt sind. Infolgedessen werden die Mukopolysaccharide nur unvollständig abgebaut. Ihre Endprodukte sind im Urin nachweisbar.

Ein Mangel an β -Galaktosidase liegt dem Morbus Hurler zugrunde. Während im Gehirn die Lysosomen mit Zerebrosiden (= Glykolipiden) angefüllt sind, häufen sich saure Mukopolysaccharide in der Leber sowie in den Fibroblasten an. Fehlt die Arylsulfatase A im lysosomalen Enzymmuster, so werden Zerebrosidsulfate in den Lysosomen des Gehirns (jedoch auch der Leber und Niere) gespeichert. Diese Erkrankung, als Leucodystrophia cerebri progressiva hereditaria Bielschowsky (= metachromatische Leukodystrophie) bezeichnet, zeigt im ZNS disseminierte Entmarkungsherde und eine Metachromasie der weißen Substanz.

Auf einen Mangel derjenigen lysosomalen Enzyme, die am Abbau des Myelins beteiligt sind, sind die Gangliosidosen

zurückzuführen.

Bei der Tay-Sachsschen amaurotischen Idiotie fehlt die β -N-Acetylgalaktosaminidase. Als Folge davon wird in die Glia- und Ganglienzellen GM_2 -Manosialogangliosid gespeichert, so daß die Markscheidenbildung gestört wird. Dies zieht eine Verblödung, Erblindung und Streckkrämpfe nach sich. Die Zellen des RES sind nicht beteiligt. Im Falle eines Morbus Niemann-Pick fehlt die lysosomale Sphingomyelinase. Die Zellen des retikulohistiozytären Systems sowie die Glia- und Ganglienzellen speichern Sphingomyeline. Neben den Symptomen, wie sie bei der Tay-Sachsschen Krankheit auftreten, finden sich als Speicherfolgen eine Leberzirrhose und eine Atmungsbehinderung.

Beim Morbus Gaucher liegt eine Speicherung von Zerebrosiden (= Kerasin) in den Zellen des RES vor. Sie beruht auf einem dominant vererbten Mangel an Glukozerebrosidase und α -Galaktosidase in den Lysosomen der Phagozyten.

Beim Morbus Fabry fehlt in den Lysosomen der Fibroblasten und der Endothelzellen (Haut, Leber, Niere, Intestinum) die Zeramidtrihexosidase. In den Lysosomen häufen sich die Glykolipide an.

Zu einer intrazellulären Stapelung "halbverdauten" Zellmaterials kann auch eine Lysosomenschwäche, die auf einem relativen Enzymmangel beruht, führen. Dieser Prozeß kommt physiologischerweise beim Altern der Zelle vor.

Beim Morbus Whipple, einer granulomatösen Entzündung der Darmlymphknoten, liegt eine relative Lysosomenschwäche der Histiozyten vor. Die Bakterien werden nur unvollständig in den Lysosomen verdaut und bleiben teilweise pathogen.

I. 4. Die lysosomalen Enzyme

Enzym	wichtigste Substrate	pH-Optimum	Literatur
<u>Proteasen und Peptidasen</u>			
Cathepsin D	Hämoglobin	3.6 - 3.8	Iodice 1966 Barett 1967
Cathepsin E	Albumin	2.5	Lapresle und Webb 1962
Cathepsin A	Pepsin	3.5 u. 5.4	Fruton 1960 Iodice 1966
Cathepsin B	Trypsin	5.0	Fruton 1960
Cathepsin C	Peptide ?	5.1	Fruton 1960
Peptidase	Tyrosilglycine	7.8	
Arylamedase	Aminosäuren Arylamide	6.8 - 7.2	Mahadevan und Tappel 1967
<u>Phosphatasen</u>			
saure Phosphatase	p-Nitrophenyl-Phosphat	5.0 - 6.0	Brightwell und Tappel 1968
Phosphoprotein-Phosphatase	Casein	5.5	Rose 1962 Revel 1963
saure Pyrophosphatase	ATP, FAD	4.0	Ragab 1968
Phosphodiesterase	bis Paranitrophenyl-Phosphat	5.2	Brightwell und Tappel 1968
<u>Enzyme hydrolisieren die Kohlehydratkette von Glycoproteinen und Glykolipiden</u>			
β-N-Acetyl-Hexosaminidase	Nitrophenyl-β-N-Acetyl-Glucosaminid	4.0 - 4.6	Sellinger 1960 Walker 1966
α-N-Acetyl-Hexosaminidase	Phenyl-α-N-Acetyl-Glucosaminid	4.5	Walker 1966
β-Galactosidase	Nitrophenyl-β-D-Galactosid	3.6	Furth und Robinson 1965
β-Glucosidase	p-Nitrophenyl-β-D-Glucopyranosid	5.0	Beck und Tappel 1968

Enzym	wichtigste Substrate	pH-Optimum	Literatur
x-Glucosidase	Maltose	5.0	Fischer und Stein 1960
x-Mannosidase	x-D-Mannosid	4.6 - 5.0	Woessner 1965
B-Xylosidase	p-Nitrophenyl-B-D-Xylopyranosid	5.0	Fisher 1967
B-Fucosidase	Fucosid	5.6 - 5.9	Woessner 1965
Sialidase	saure Sialid- dervidate	4.0 - 4.4	Mahadevan 1967
Aspartylglucosylamin Amidohydrolase	Aspartylglycosamin	7.6	Mahadevan und Tappel 1967
O-Seryl-N-Acetyl-Galactosaminid-Glycosidase	Seryl-Acetyl-Galactosaminid	4.4	Mahadevan und Tappel 1968

Enzyme, welche die Glycosaminoclycane spalten

Lysosome	depolymerisierte Mucopolysaccharide	3.5	Gibian 1966
Hyaluronidase	Hyaluron-Säure	3.5	Aronson und Davidson 1967
B-Glucuronidase	B-D-Glucuronid	4.5 - 5.2	Fishman 1961
Arylsulfatase A und B	Nitrocatechol-Sulfat	A 4.9, B 5.9	Mehl und Jatzkewitz 1963

Enzyme, die Lipide spalten

Triglycerid-Lipase	Triglyceride	4.2	Mahadevan und Tappel 1968
Phosphorlipase	Lecithin, Isolecithin	4.5	Mellors und Tappel 1967
Esterase	Fettsäure-Ester der p-Nitrophenole	3.6 - 4.0	Mahadevan und Tappel 1968

Enzym	wichtigste Substrate	pH-Optimum	Literatur
Glucocere- brosidase	Glucocere- broside	6.0	Brady 1966 Weinreb 1968
Galacto- Cerebrosid	Galactocere- brosid	6.0	Brady 1966 Weinreb 1968
Sphingo- myelinase	Sphingo- myelin	5.0	Brady 1966 Weinreb 1968

I. 5. Übersicht über die bisher untersuchten Gewebearten

Die Lysosomen wurden untersucht:

In der Leber - (de Duve 1949);

sie wurden ausführlich in der Niere untersucht,

- in den Glomerulumzellen - (Latta und Maunsbach 1962),

- im Juxtaglomerulären Apparat - (Fisher und Lee 1966),

- in den proximalen Tubuluszellen - (Strauß und Holt 1954),

- in den Zellen der Henleschen Schleife - (Novikoff 1963 und Goldfischer 1963 und 1964);

im Nebennierenmark - (Smith und Winkler 1966);

in der Milz - (Barka 1961);

in der Thymusdrüse - (Barka 1961, Hayashi 1961, 1964);

in den Lymphknoten - (Barka 1961, Braunstein 1962, Hayashi 1964);

im Neuron - (Holtzmann und Novikoff 1965);

im Knochensystem - (Doty 1968);

im Uterus - (Baba und Von Haam 1967, Novikoff 1961);

im Hoden - (Conchie 1956, 1959);

im Epididymis - (Lake 1962);

in der Vorsteherdrüse - (Brandes 1965);

im Vas Deferens - (Martan und Risley 1963);

im Prostata - (Brandes 1963);

im Spermien - (Buongiorno-Nardelli 1967);

im Ovar - (Novikoff 1959, 1960);

im Korpus Luteum - (Lobel 1961);

im Vagina und Cervix - (Roig de Vargas-Lenares 1968);

in den Leukozyten - (Cohn und Benson 1965, Lazarus 1968);

in den Lymphozyten - (Allison und Mallucci 1964);

im Bindegewebe - (Dingle 1961);

Eine ausführliche Studie der Enzyenausstattung in der Glandula Submandibularis wurde erstmals durch Hochstrasser und Haddad 1972 durchgeführt.

II. Material und Methoden

1. Versuche zur Anreicherung

Die lysosomalen Enzyme von zwei Drüsen species

A) Mensch und

B) Ratte

wurden untersucht.

a) Art der Gewebe

A) Mensch

Die Submandibularisdrüsen wurden von Leichen gesunder Menschen aus dem Gerichtsmedizinischen Institut der Universität München *) gewonnen.

Die Drüsen wurden spätestens 10 bis 15 Stunden nach Eintritt des Exitus den Leichen entnommen.

Das Drüsengewicht betrug 13 bis 15 g. Die Drüsen wurden im Verhältnis 1 g Drüsengewicht : 10 ml Sucroselösung 0,25 M vom pH 6,8 bis 7,0 bei 18 °C sofort nach der Entnahme zerkleinert und eingelegt.

Im Ultraturax wurden die Gewebe weiter zerkleinert. Der entstandene Gewebebrei wurde im Zellhomogenisator vom Typ Colora weiter aufgeschlossen. Gewebe und gröbere Zellbestandteile wurden abzentrifugiert. Der opalisierende Überstand wurde in der Ultrazentrifuge fraktioniert zentrifugiert. Nach jeder Stufe wurde Sediment und Überstand getrennt, das Sediment in 0,25 M Sucroselösung suspendiert und der Überstand zur weiteren Zentrifugation verwendet. Eiweiß wurde in aliquoten Teilen nach alkalischer Hydrolyse durch Ninhydrinreaktion bestimmt. Als Leitenzym wurde die saure Phosphatase verwendet, da nach der Definition von de Duve Lysosomen saure Phosphatase enthalten müssen.

B) Ratte

Die Rattendrüsen wurden aus gesunden Albinoratten entnommen. Die Tiere wogen zwischen 150 und 250 g. Der Exitus erfolgte durch einen Schlag auf den Kopf. Die Drüsen wur-

den unmittelbar nach dem Tod entnommen und in 0,25 M Sucroslösung eingelegt.

Das Drüsengewicht betrug 2 bis 5 g.

Die weitere Anreicherung erfolgte analog der Submandibularis beim Menschen.

b) Substrate

4-Nitrophenylphosphat, Bis-(4-Nitrophenyl)-phosphat, 4-Nitrophenyl- β -D-glucopyranosid, 4-Nitrophenyl- β -D-glucopyranosiduronsäure Merck; 4-Nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminid, 4-Nitrophenyl- α -D-mannopyranosid, 4-Nitrophenyl- β -D-xylopyranosid, 4-Nitrophenyl- α -L-fucopyranosid, 4-Nitrophenyl- α -D-galaktopyranosid, 4-Nitrophenyl- β -D-galaktopyranosid, Serva; Hämoglobin Serva.

Diese Substrate wurden sowohl bei menschlichen, als auch Rattendrüsen verwendet.

II. 2. Methode zur Isolierung

a) Wahl des Lösungsmittels

Sucroselösung ist im allgemeinen das Lösungsmittel der Wahl zur Isolierung und Konservierung der Lysosomen. Durch sie ist ein Medium mit osmotischem Potential erreichbar, das ausreichend ist, um ein Anschwellen und Platzen der Partikel zu vermeiden.

Bei der Submandibularis des Menschen wurde in ähnlicher Art und Weise 0,2 M KCl-Lösung in einem Parallelversuch benutzt. Die Enzymaktivität war ebenso wie bei Sucrose-lösung, sie konnte jedoch bei verschiedenen Enzymen nicht so lange erhalten bleiben wie bei Sucrose-Lösung.

b) Haltbarkeit der Enzyme bei verschiedenen Temperaturen und Lösungsmitteln

Durchschnittlicher Aktivitätsverlust bei Aufbewahrung der Lysosomensuspension in Sucroselösung

Enzym	Temp.	24 Std.	48 Std.	3 Tage	5 Tage	7 Tage
saure Phosphatase	4 °C	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
	25 °C	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
Mannosidase	4 °C	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
	25 °C	0 %	0 %	2 %	12 %	18 %
N-Acetyl- gluco- saminidase	4 °C	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
	25 °C	0 %	0 %	0 %	5 %	12 %

Durchschnittlicher Aktivitätsverlust bei Aufbewahrung der Lysosomensuspension in KCl

Enzym	Temp.	24 Std.	48 Std.	3 Tage	5 Tage	7 Tage
saure Phosphatase	4 °C	0 %	0 %	0 %	2 %	3 %
	25 °C	0 %	0 %	0 %	6 %	8 %
Mannosidase	4 °C	0 %	0 %	0 %	3 %	3 %
	25 °C	0 %	0 %	4 %	8 %	14 %
N-Acetylglucosaminidase	4 °C	0 %	0 %	0 %	2 %	6 %
	25 °C	0 %	0 %	0 %	8 %	16 %

c) Fraktionierung durch die Ultrazentrifuge

Nach 5 Minuten homogenisieren im Zellhomogenisator vom Typ Colora wurde menschliche Submandibularis-Drüsenbrei bei 3000 Umdrehungen zentrifugiert. Der Rückstand bestand hauptsächlich aus grobem Gewebe und Blutkörperchen. Der opalisierende Überstand wurde in der Ultrazentrifuge weiter fraktioniert zentrifugiert nach folgender Methode:

10 Minuten zentrifugieren bei 2000 g, Nachweis von sauren Phosphatasen und Eiweiß im Überstand und Rückstand. Der Rückstand wurde im Verhältnis von 1 g Gewicht : 10 ml Sucroselösung gelöst. Der Überstand wurde weiter bei 25 000 g für 30 Minuten ultrazentrifugiert. Rückstand und Überstand wurden erneut auf saure Phosphatase untersucht. Die Hauptaktivität blieb ebenfalls im Überstand. Der Überstand wurde bei 30 000 g für 45 Minuten weiter ultrazentrifugiert; anschließend erfolgte Probe auf saure Phosphatase in beiden Fraktionen. Der braune Rückstand war aktiv. Der Überstand wurde bei 30 000 g 60 Minuten lang ultrazentrifugiert. Der gelöste Rückstand schien sehr aktiv zu sein.

Der Überstand zeigte dagegen schwache Aktivität.

Es ergibt sich somit die Schlußfolgerung, daß die aktivsten Fraktionen der menschlichen Submandibularis-Drüse bei 30 000 g und zwischen 45 und 60 Minuten Ultrazentrifugation liegen.

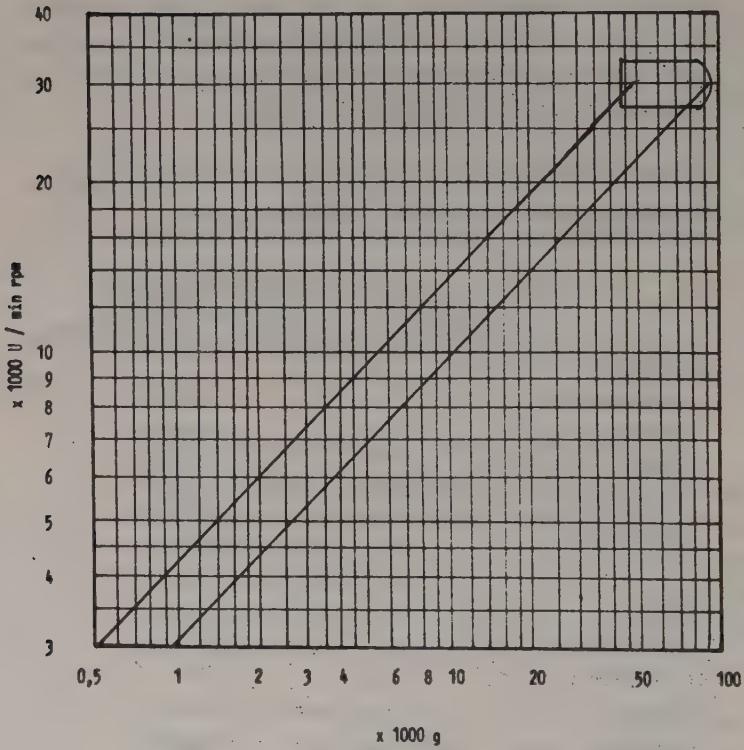
Bei der Submandibularis der Ratte erfolgte die fraktionierte Untersuchung analog der des menschlichen Gewebes, wobei sich die Schlußfolgerung ergibt, daß die aktivsten Fraktionen zwischen 20 000 und 30 000 g und bei 20 bis 30 Minuten Ultrazentrifugation liegen.

Anreicherung der Lysosomen durch fraktionierte Ultrazentrifugation aus der Glandula submandibularis

		t	saure Phosphatase
g x 1000		(min)	nmol/mg Prot./Std.
			freiges. 4-Nitrophenol
<u>1. Mensch</u>			
Rohhomogenat			870
Rückstand	8	10	2860
Überstand			1980
Rückstand	30	30	4770
Überstand			1390
<u>2. Ratte</u>			
Rohhomogenat			2540
Rückstand	8	10	2240
Überstand			1270
Rückstand	17	20	5080
Überstand			900
Rückstand	30	30	4800
Überstand			696
Rückstand	50	60	1540
Überstand			328

d) Berechnung der Drehzahl in Schwerfeld (g)

Als Ultrazentrifuge wurde ein Rotor 6 x 100 ml in Winkelstellung mit hermetisch schließendem Deckel verwendet.

Drehzahl-Schwerefeld-Diagramm für Rotor 9510

II. 3. Methoden zum Nachweis der einzelnen Enzyme

a) Bestimmung der sauren Phosphatasen

Verwendete Geräte:

- Eppendorf Spektralphotometer -
für die Messung ist ein Filter von 405 nm erforderlich
- Wasserbad 37 °C
- Minutenuhr
- pH-Meter mit Glaselektroden.

Reagenzien:

- 4-Nitrophenylphosphat
- Citratpuffer
- Natronlauge
- Salzsäure

Arbeitsweise:

Das Enzym wird in Anlehnung an bekannte Methoden (18) nach der Zweipunktmethode bestimmt; 0,01 - 0,05 ml Lysosomensuspension, 1 ml 4-Nitrophenylphosphat (Endkonzentration $4,58 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ in Citratpuffer (0,2 M)). Je nach Aktivität der Proben wird 10 bis 30 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 10 ml 0,1 NaOH unterbrochen und die Extinktion bei 405 nm gegen einen Reagentienleerwert, der die gleiche Menge Lysosomen enthält, bestimmt. Die Extinktion wird anhand einer Eichkurve mit 4-Nitrophenol in nm freigesetzten 4-Nitrophenyl/mg Protein/Std. umgerechnet.

b) Eichkurve zur Bestimmung des freigesetzten P-Nitrophenols

Verschiedene Konzentrationen wurden freigesetzt und mit NaOH hydrolysiert; Endvolumen 10 ml. Bei 405 nm wurden die verschiedenen Konzentrationen gemessen (s. Tabelle Eichkurven).

c) Eiweißbestimmung - Ninhydrinreaktion

Standard: 0,1 ml 1,0 ml NaOH (2,5 n) 50 g Lysosomen-
suspension

0,1 ml 1,0 ml NaOH (2,5 n) 100 g " "

0,1 ml 1,0 ml NaOH (2,5 n) 150 g " "

60 Minuten im Wasserbad erhitzen, dann in jede Probe
1 ml 30 %ige Essigsäure sowie 2 ml Ninhydrinreagenz
zufügen; 30 Minuten kochen, 10 ml Propanol/Wasser
1 : 1 zugeben. Extinktion gegen Wasser bei 578 nm ab-
lesen.

d) Cathepsin D-Bestimmung

4 %ige Hb : Wasser (W/V) 12 Stunden dialysieren,

Probe: Citratpuffer pH 3 0,25 ml

Lysosomensuspension 0,50 ml

Hb-Lösung 0,25 ml

1 Stunde im Wasserbad bei 45 °C inkubieren.

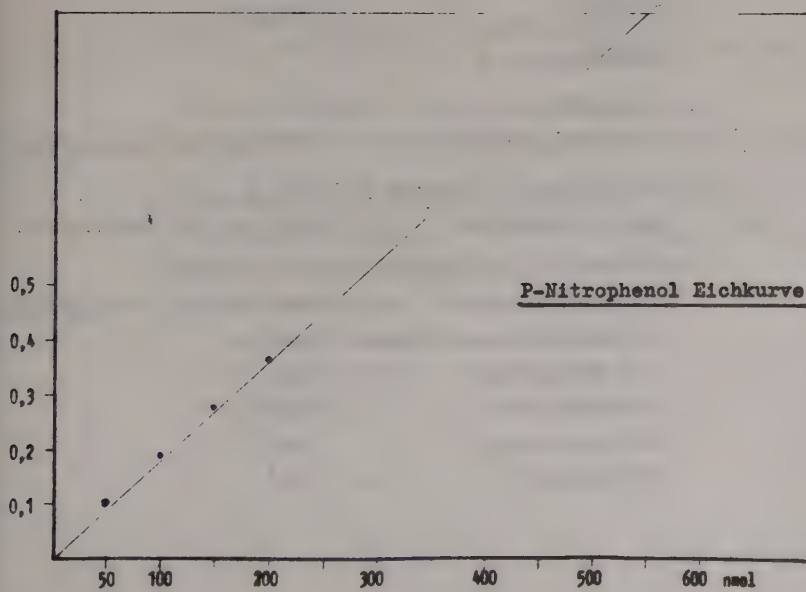
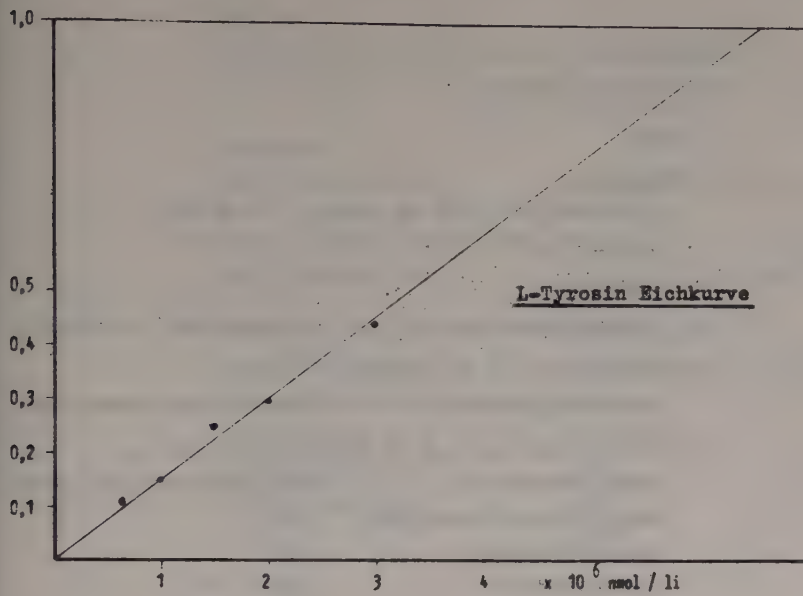
Danach 5 ml 3 %ige Trichloressigsäure zugeben, 5 Minu-
ten reagieren lassen, zentrifugieren, filtrieren.

2 ml in Zentrifugeglas geben, 7 ml 0,5 n NaOH, 1,5 ml
Folienreagens zufügen, schütteln, 10 Minuten stehen
lassen, gegen Leerwert bei 578 nm ablesen.

Cathepsin-D-Aktivität wurde in nm Tyrosin-Equivalente
pro Stunde gemessen. Die spezifische Aktivität wurde
in nm Tyrosin-Equivalente pro Milligramm Enzymprotein
gemessen.

e) Tyrosin-Eichkurve

siehe Skizze



III. Ergebnisse

1. Eigene Untersuchungen

a) Mensch

Drüse Nr. 1

- 64jähriger Mann, 80 kg schwer, 172 cm groß -
- Drüsengewicht 16 g -

im Homogenat

saure Phosphatase 1000 nmol/mg Protein/Std.

Rückstand nach 10 Minuten bei 8000 g

saure Phosphatase 3380 nmol/mg Protein/Std.

Rückstand jeweils nach 30 Minuten bei 30000 g

saure Phosphatase 5320 nmol/mg Protein/Std.

N-Acetyl-glucosaminidase 1020 " "

α -D-Mannosidase 510 " "

α -Glucosidase 790 " "

β -Glucoronidase 266 " "

Cathepsin D $7,9 \cdot 10^6$

Drüse Nr. 2

- 62jähriger Mann, 67 kg schwer, 169 cm groß -
- Drüsengewicht 15 g -

im Homogenat

saure Phosphatase 870 nmol/mg Protein/Std.

Rückstand nach 10 Minuten bei 8000 g

saure Phosphatase 2860 nmol/mg Protein/Std.

Rückstand jeweils nach 30 Minuten bei 30000 g

saure Phosphatase 4770 nmol/mg Protein/Std.

N-Acetyl-glucosaminidase 2120 " "

α -D-Mannosidase 535 " "

α -Glucosidase 895 " "

β -Glucoronidase 269 " "

Cathepsin D $6,6 \cdot 10^6$

Drüse Nr. 3

- 49jährige Frau, 77 kg schwer, 164 cm groß -
- Drüsengewicht 14 g -

im Homogenat

saure Phosphatase 126 nmol/mg Protein/Std.

Rückstand nach 10 Minuten bei 8000 g

saure Phosphatase 1680 nmol/mg Protein/Std.

Rückstand jeweils nach 30 Minuten bei 30000 g

saure Phosphatase 3600 nmol/mg Protein/Std.

N-Acetyl-glucosaminidase 1000 " "

x-D-Mannosidase 650 " "

x-Glucosidase 320 " "

β-Glucoronidase 125 " "

Cathepsin D $4,5 \cdot 10^6$

Drüse Nr. 4

- 38jähriger Mann, 62 kg schwer, 161 cm groß -
- Drüsengewicht 15 g -

im Homogenat

saure Phosphatase 880 nmol/mg Protein/Std.

Rückstand nach 10 Minuten bei 8000 g

saure Phosphatase 1690 nmol/mg Protein/Std.

Rückstand jeweils nach 30 Minuten bei 30000 g

saure Phosphatase 5000 nmol/mg Protein/Std.

N-Acetyl-glucosaminidase 1300 " "

x-D-Mannosidase 525 " "

x-Glucosidase 450 " "

β-Glucoronidase 250 " "

Cathepsin D $4,5 \cdot 10^6$

Drüse Nr. 5

- 65jähriger Mann, 70,2 kg schwer, 163 cm groß -
- Drüsengewicht 15 g -

im Homogenat

saure Phosphatase 652 nmol/mg Protein/Std.

Rückstand nach 10 Minuten bei 8000 g

saure Phosphatase 1960 nmol/mg Protein/Std.

Rückstand jeweils nach 30 Minuten bei 30000 g

saure Phosphatase 6680 nmol/mg Protein/Std.

N-Acetyl-glucosaminidase 1300 " "

x-D-Mannosidase 537 " "

x-Glucosidase 565 " "

β-Glucoronidase 202 " "

Cathepsin D $3.74 \cdot 10^6$ Drüse Nr. 6

- 24jähriger Mann, 61 kg schwer, 167 cm groß -
- Drüsengewicht 13 g -

im Homogenat

saure Phosphatase 748 nmol/mg Protein/Std.

Rückstand nach 10 Minuten bei 8000 g

saure Phosphatase 1830 nmol/mg Protein/Std.

Rückstand jeweils nach 30 Minuten bei 30000 g

saure Phosphatase 7160 nmol/mg Protein/Std.

N-Acetyl-glucosaminidase 1700 " "

x-D-Mannosidase 471 " "

x-Glucosidase 915 " "

β-Glucoronidase 237 " "

Cathepsin D $4.72 \cdot 10^6$

Drüse Nr. 7

- 25jähriger Mann, 59,8 kg schwer, 170 cm groß -
- Drüsengewicht 15 g -

im Homogenat

saure Phosphatase 1120 nmol/mg Protein/Std.

Rückstand nach 10 Minuten bei 8000 g

saure Phosphatase 2580 nmol/mg Protein/Std.

Rückstand jeweils nach 30 Minuten bei 30000 g

saure Phosphatase 7280 nmol/mg Protein/Std.

N-Acetyl-glucosaminidase 850 " "

α -D-Mannosidase 638 " "

α -Glucosidase 1030 " "

β -Glucuronidase 850 " "

Cathepsin D $6.38 \cdot 10^6$

Drüse Nr. 8

- 39jähriger Mann, 72 kg schwer, 162 cm groß -
- Drüsengewicht 15 g -

im Homogenat

saure Phosphatase 700 nmol/mg Protein/Std.

Rückstand nach 10 Minuten bei 8000 g

saure Phosphatase 1850 nmol/mg Protein/Std.

Rückstand jeweils nach 30 Minuten bei 30000 g

saure Phosphatase 5300 nmol/mg Protein/Std.

N-Acetyl-glucosaminidase 830 " "

α -D-Mannosidase 610 " "

α -Glucosidase 965 " "

β -Glucuronidase 310 " "

Cathepsin D $7.24 \cdot 10^6$

b) Ratte

Drüse Nr. 1

saure Phosphatase

im Homogenat		2540	nmol/mg Prot./Std.
Rückstand 10 Min. bei 8000 g		2240	" "
Überstand		1270	" "
Rückstand 20 Min. bei 17000 g		5080	" "
Überstand		900	" "
Rückstand 30 Min. bei 30000 g		4800	" "
Überstand		696	" "
Rückstand 60 Min. bei 60000 g		1540	" "
Überstand		328	" "

Rückstand 20 bis 30 Min. bei 20000 bis 30000 g

saure Phosphatase	5080	nmol/mg Prot./Std.
N-Acetyl-glucosaminidase	3020	" "
Mannosidase	3300	" "
Diesterase	1870	" "
Xylosidase I (pH 5,5)	565	" "
Xylosidase II (pH 4,0)	445	" "
α -Fucosidase	445	" "
Glucorinidase	326	" "
β -Glucosidase	460	" "
α -Galactosidase	326	" "
β -Galactosidase	760	" "

Drüse Nr. 2

saure Phosphatase

im Homogenat		1452	nmol/mg Prot./Std.
Rückstand 10 Min. bei 8000 g		1890	" "
Überstand		1224	" "
Rückstand 20 Min. bei 17000 g		4700	" "
Überstand		884	" "
Rückstand 30 Min. bei 30000 g		2000	" "
Überstand		718	" "
Rückstand 60 Min. bei 60000 g		1950	" "
Überstand		468	" "

Rückstand 20 bis 30 Min. bei 20000 bis 30000 g

saure Phosphatase	4700	nmol/mg Prot./Std.	
N-Acetyl-glucosaminidase	2900	"	"
Mannosidase	2120	"	"
Diesterase	1950	"	"
Xylosidase I (pH 5,5)	580	"	"
Xylosidase II (pH 4,0)	500	"	"
α -Fucosidase	500	"	"
Glucoronidase	470	"	"
β -Glucosidase	470	"	"
α -Galactosidase	390	"	"
β -Galactosidase	860	"	"

Drüse Nr. 3

saure Phosphatase

im Homogenat	1600	nmol/mg Prot./Std.	
Rückstand 10 Min. bei 8000 g	2420	"	"
Überstand	1370	"	"
Rückstand 20 Min. bei 17000 g	4970	"	"
Überstand	1010	"	"
Rückstand 30 Min. bei 30000 g	4360	"	"
Überstand	668	"	"
Rückstand 60 Min. bei 60000 g	2106	"	"
Überstand	508	"	"

Rückstand 20 bis 30 Min. bei 20000 bis 30000 g

saure Phosphatase	4970	nmol/mg Prot./Std.	
N-Acetyl-glucosaminidase	3380	"	"
Mannosidase	2480	"	"
Diesterase	1820	"	"
Xylosidase I (5,5 pH)	875	"	"
Xylosidase II (4,0 pH)	545	"	"
α -Fucosidase	545	"	"
Glucoronidase	675	"	"
β -Glucosidase	545	"	"
α -Galactosidase	545	"	"
β -Galactosidase	685	"	"

Drüse Nr. 4

saure Phosphatase

im Homogenat		1940	nmol/mg	Prot./Std.
Rückstand 10 Min. bei 8000 g		1840	"	"
Überstand		1430	"	"
Rückstand 20 Min. bei 17000 g		3980	"	"
Überstand		1252	"	"
Rückstand 30 Min. bei 30000 g		4100	"	"
Überstand		936	"	"
Rückstand 60 Min. bei 60000 g		1430	"	"
Überstand		605	"	"

Rückstand 20 bis 30 Min. bei 20000 bis 30000 g

saure Phosphatase	3980	nmol/mg	Prot./Std.
N-Acetyl-glucosaminidase	2980	"	"
Mannosidase	2340	"	"
Diesterase	1690	"	"
Xylosidase I (pH 5,5)	750	"	"
Xylosidase II (pH 4,0)	469	"	"
α -Fucosidase	690	"	"
Glucoronidase	595	"	"
β -Glucosidase	469	"	"
α -Galactosidase	469	"	"
β -Galactosidase	705	"	"

Drüse Nr. 5

saure Phosphatase

im Homogenat		1616	nmol/mg	Prot./Std.
Rückstand 10 Min. bei 8000 g		1884	"	"
Überstand		1616	"	"
Rückstand 20 Min. bei 17000 g		2900	"	"
Überstand		1142	"	"
Rückstand 30 Min. bei 30000 g		2560	"	"
Überstand		908	"	"
Rückstand 60 Min. bei 60000 g		2560	"	"
Überstand		664	"	"

Rückstand 20 bis 30 Min. bei 20000 bis 30000 g

saure Phosphatase	2900	nmol/mg	Prot./Std.
N-Acetyl-glucosaminidase	4200	"	"
Mannosidase	1930	"	"
Diesterase	1120	"	"
Xylosidase I (pH 5,5)	360	"	"
Xylosidase II (pH 4,0)	330	"	"
α -Fucosidase	330	"	"
Glucoronidase	345	"	"
β -Glucosidase	338	"	"
α -Galactosidase	345	"	"
β -Galactosidase	470	"	"

III. 2. pH-Optimum und Michaelis-Konstante

a) Bestimmung der pH-Optima

Für die Bestimmung der absoluten Enzymaktivitäten ist es notwendig, die jeweiligen pH-Optima zu kennen. Für die verschiedenen Enzyme wurden diese Optima durch Bestimmung der Aktivität bei verschiedenen pH-Werten ermittelt. Na-Citrat x HCl-Puffer 0,2 m. pH 3,0 - 7,5 in Intervallen von 0,5 pH-E: Substratkonzentration $5,0 \cdot 10^{-3}$ M für die 4-Nitrophenylsubstrate.

b) Bestimmung der Michaelis-Konstanten

Für die Bestimmung der Michaelis-Konstanten wurden die Substrate in pH-Optimum-Pufferlösungen von Na-Citrat und KCl gelöst. Dabei wurden jeweils verschiedene Konzentrationen von 1×10^{-3} mol/lit. verwendet, bis eine maximale Enzymsättigung erreicht war.

c) pH-Optimum und Michaelis-Konstanten für die Bestimmung der einzelnen Enzyme der Glandula submandibularis beim Menschen und bei der Ratte

saure Phosphatase

Verschiedene Kurven für die pH-Optima der sauren Phosphatase wurden konstruiert. Diese differierten von Puffer zu Puffer und von Substrat zu Substrat. Shibko und Tappel erreichten eine maximale Aktivität bei pH 5,4 bei Leber-Lysosomen von Ratten. Dabei wurde p-Nitrophenyl-Phosphat als Substrat verwendet.

Ein Enzym, isoliert aus der Milz eines Bovins durch Chersi et al. (1966) zeigte seine optimale Aktivität zwischen pH 3,0 und 4,8, ebenfalls mit p-Nitrophenyl-Phosphat als Substrat.

DiPietro und Zengerle (1967) fanden ein Optimum von pH 4,0 bis 4,4 in menschlichen Placenta-Enzymen.

Bei der sauren Phosphatase der Glandula submandibularis des Menschen wurden zwei verschiedene pH-Optima gefunden, und zwar bei pH 5,0 und pH 6,0.

Bei der Submandibularis der Ratte wurde ein pH von 5,5 festgestellt.

Die Michaelis-Konstante der menschlichen Submandibularis-saure Phosphatase lag bei $3,6 \cdot 10^{-3}$ nmol/ml.; die der Ratte lag bei $1,0 \cdot 10^{-3}$ nmol/ml.

N-Acetyl- β -glucosaminidase

Nach verschiedenen Arbeiten von Weismann et al. (1964), Coleman et al. (1967, Robinson und Stirling (1968)

liegt das pH-Optimum der N-Acetyl- β -glucosaminidase in der Leber, im Uterus und in der Milz bei 4,5.

Bei der Glandula submandibularis des Menschen liegt das pH-Optimum bei 4,0, in der der Ratte bei 4,5.

Die Michaelis-Konstante der menschlichen Drüse betrug $0,8 \cdot 10^{-3}$ nmol/ml, die der Ratte liegt bei $0,5 \cdot 10^{-3}$ nmol/ml.

x-D-Mannosidase

Die Arbeiten von Bowers und de Duve (1967) zeigten das Vorkommen der x-D-Mannosidase in verschiedenen Gewebe-

arten. Das pH-Optimum des Enzyms liegt bei 5,0. Als Substrat wurde p-Nitrophenyl-x-D-Mannosid verwendet.

Das pH-Optimum der x-D-Mannosidase der menschlichen Submandibularis liegt bei 4,5, das der Ratte bei 5,0.

Die Michaelis-Konstante liegt bei $1,0 \cdot 10^{-3}$ nmol/ml beim Menschen; bei der Ratte liegt sie bei $2,0 \cdot 10^{-3}$ nmol/ml.

x-D-Glucosidase

Das Enzym konnte nur bei der menschlichen Submandibularis nachgewiesen werden. Die maximale Aktivität lag bei pH 4,0. Als Substrat wurde p-Nitrophenyl-x-D-Glucosid verwendet.

Bei früheren Arbeiten von Torres und Olavarria (1964) wurde das Enzym in der Hundeleber nachgewiesen. Es zeigte eine maximale Aktivität bei pH 4,8. Als Substrat wurde Maltose verwendet.

Die Michaelis-Konstante lag bei $1,0 \cdot 10^{-3}$ nmol/ml.

β -D-Glucosidase

Das Enzym wurde in der Submandibularis der Ratte nachgewiesen. Es zeigte eine maximale Aktivität bei pH 5,5. Beck und Tappel (1968) wiesen bei der Rattenleber ein pH von 5,5 unter Verwendung von Nitrophenyl- β -D-Glucopyranosid als Substrat nach.

Die Michaelis-Konstante lag bei $0,5 \cdot 10^{-3}$ nmol/ml.

β -D-Glucoronidase

Die β -D-Glucoronidase zeigte verschiedene pH-Optima in den verschiedenen Geweben; pH 4,3 in dem Enzym der menschlichen Leber Musa at al. (1965), pH 4,8 in der Bovin-Leber Flapp und Cole (1966), pH 5,2 im Bovin-Herz Romeo und De Bernard (1968).

Bei der Submandibularis des Menschen wurde ein pH-Optimum von 4,5 nachgewiesen, in der Drüse der Ratte lag das pH-Optimum bei 5,0.

Die Michaelis-Konstante der menschlichen Submandibularis betrug $0,8 \cdot 10^{-3}$ nmol/ml, die der Ratte $0,3 \cdot 10^{-3}$ nmol/ml.

α -Galactosidase

Coleman (1968) zeigte im Uterus der Ratte ein pH-Optimum von 5,2.

Bei der Ratten-Submandibularis konnte ein pH-Optimum von 4,5 nachgewiesen werden.

Die Michaelis-Konstante lag bei $0,5 \cdot 10^{-3}$ nmol/ml.

β -D-Galactosidase

Levy at al. (1962) zeigte, daß die Enzyme der Bovin-Leber ein breites pH-Optimum-Spektrum besitzen (4,0 bis 7,0).

Bei der Ratten-Submandibularis wurde ein pH-Optimum von 4,5 nachgewiesen.

Die Michaelis-Konstante lag bei $0,7 \cdot 10^{-3}$ nmol/ml.

β -D-Xylosidase

Das Enzym zeigte bei der Ratten-Submandibularis zwei verschiedene pH-Optima bei 4,0 und 5,0.

Fisher et al. (1967) sowie Robinson und Abrahams (1967) wiesen die größte Aktivität in der Rattenleber bei pH 5,0 nach.

Die Michaelis-Konstante der Ratten-Submandibularis lag bei $0,5 \cdot 10^{-3}$ nmol/ml.

α -L-Fucosidase

Lévy und McAllan (1961) fanden eine α -L-Fucosidase in der Epidymis der Ratte mit einem pH-Optimum von 6,1.

Die Ratten-Submandibularis zeigte ein pH-Optimum von 6,0.

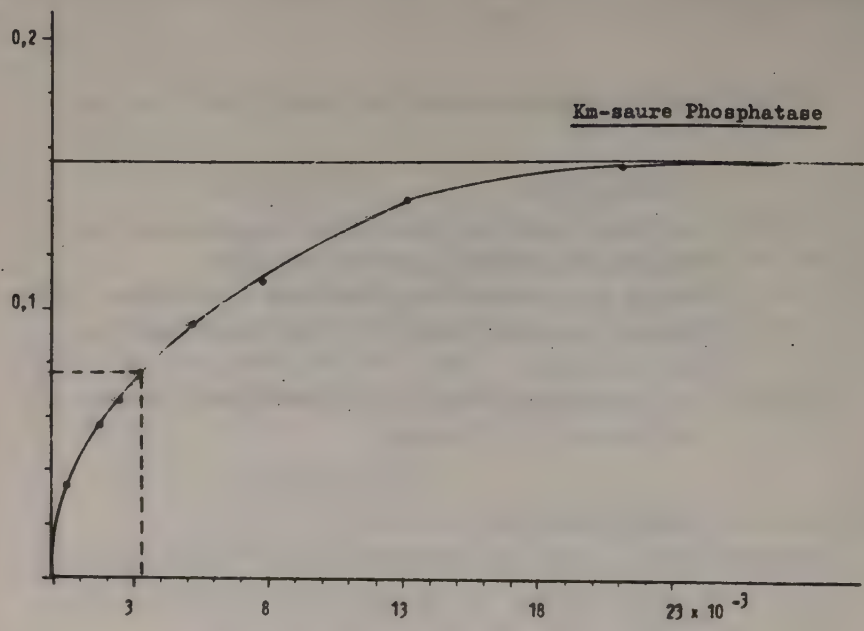
Die Michaelis-Konstante lag bei $0,4 \cdot 10^{-3}$ nmol/ml.

Diesterase

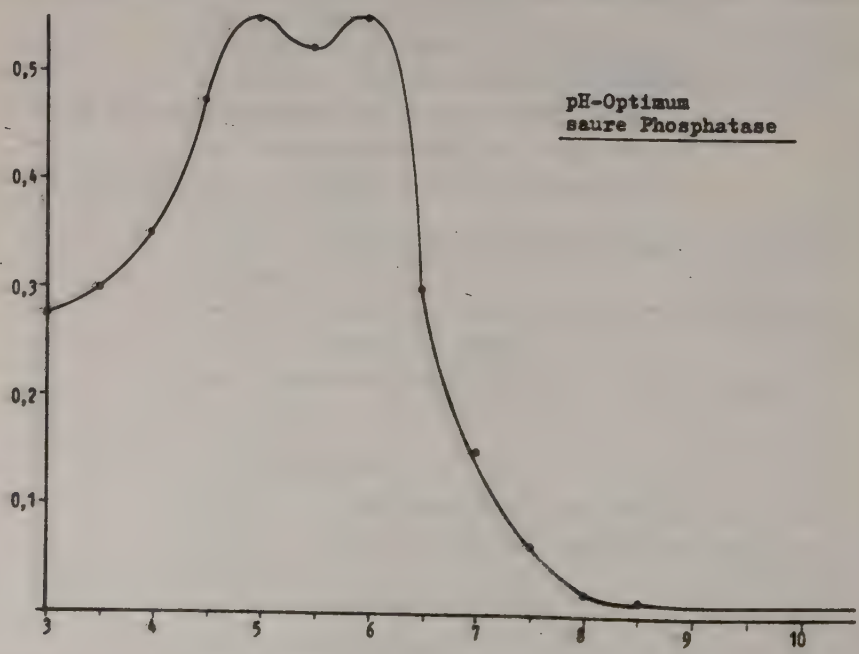
Die Diesterase wurde in der Submandibularis der Ratte nachgewiesen. Das pH-Optimum lag bei 6,0.

Die Michaelis-Konstante betrug $1,1 \cdot 10^{-3}$ nmol/ml.

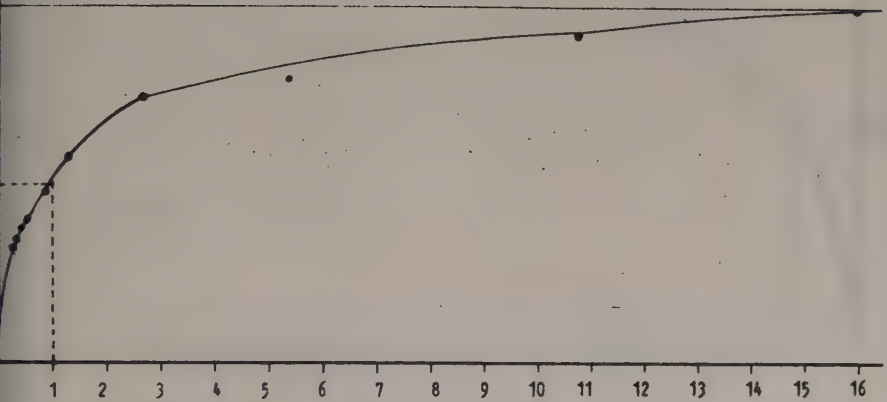
Km-saure Phosphatase



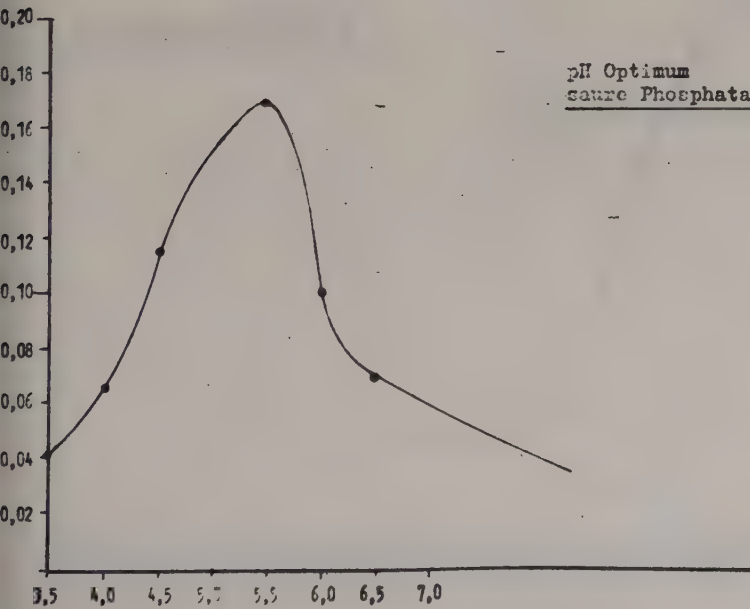
pH-Optimum
saure Phosphatase

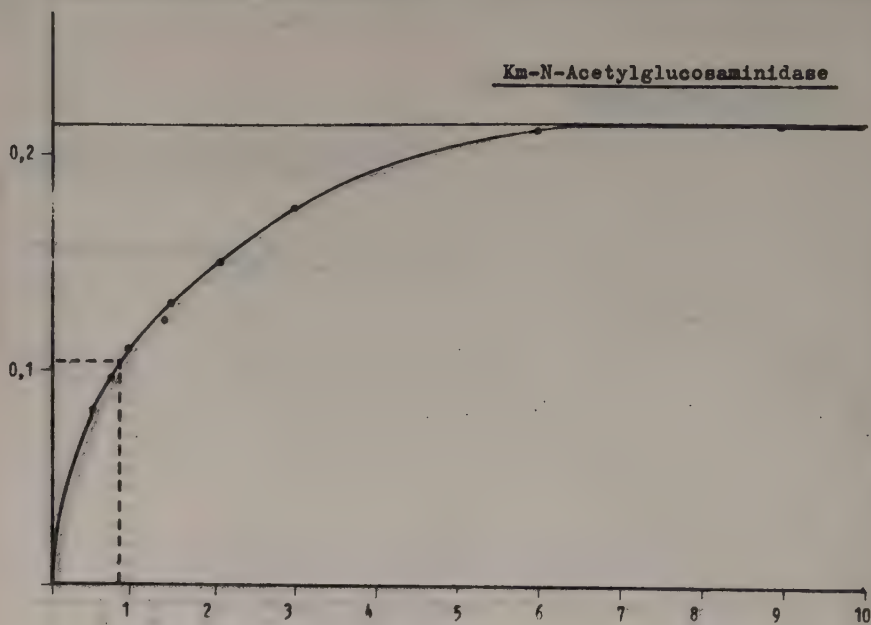
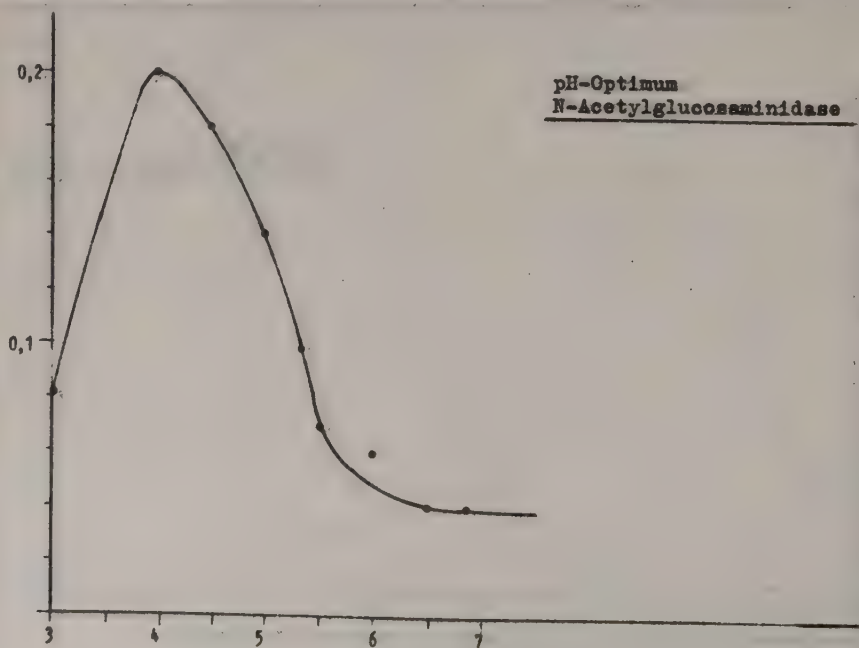


K_m saure Phosphatase - Ratte

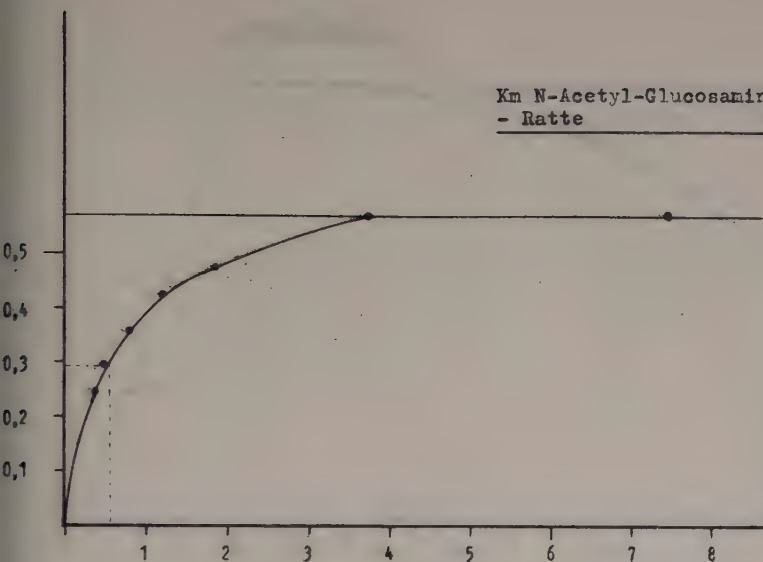


pH Optimum
saure Phosphatase - Ratte

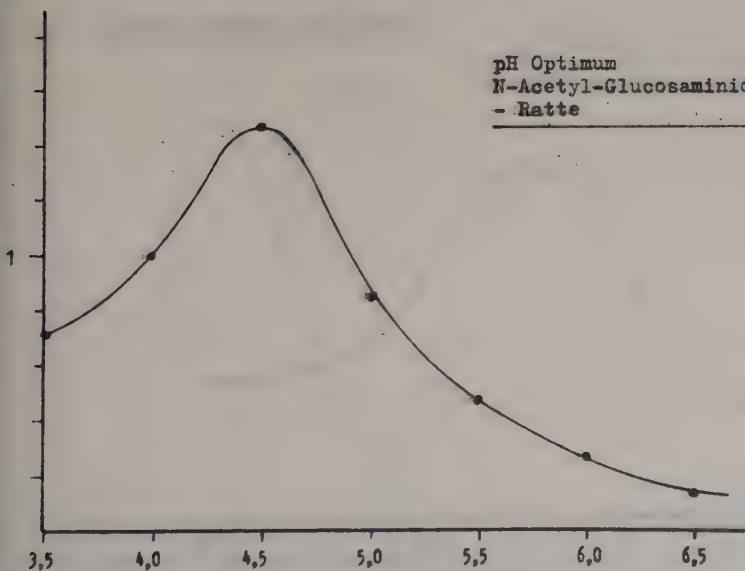


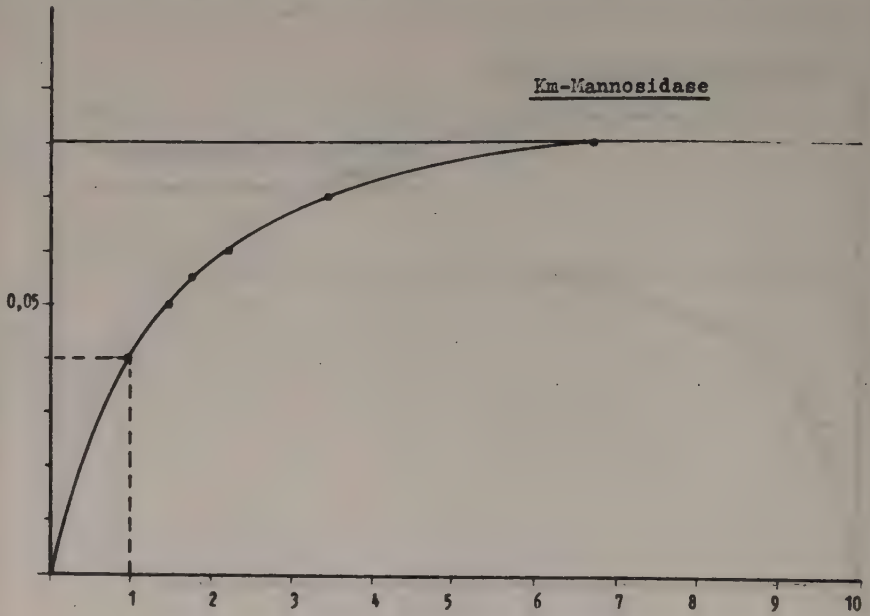
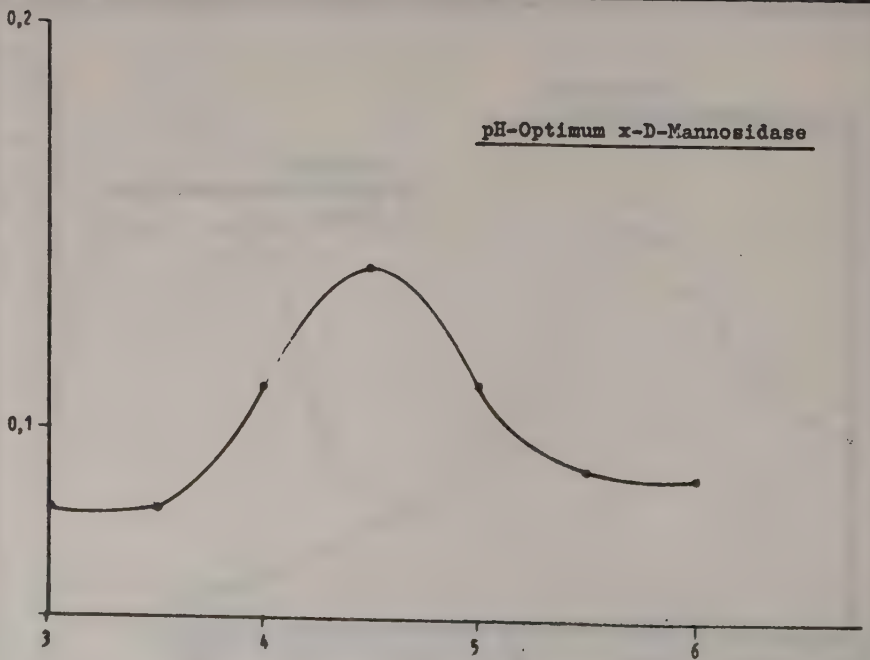
Km-N-AcetylglucosaminidasepH-Optimum
N-Acetylglucosaminidase

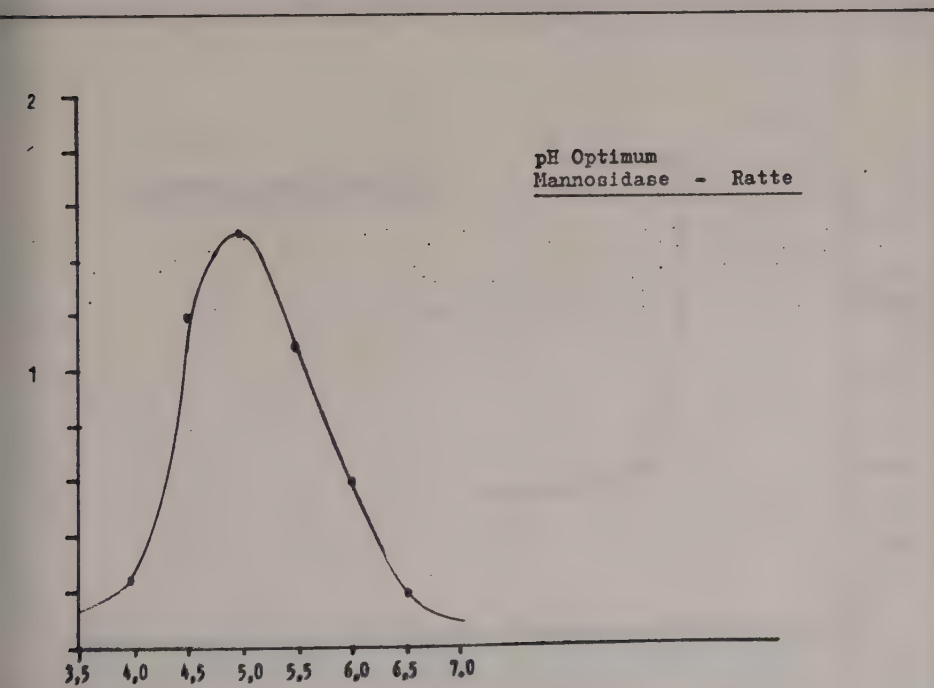
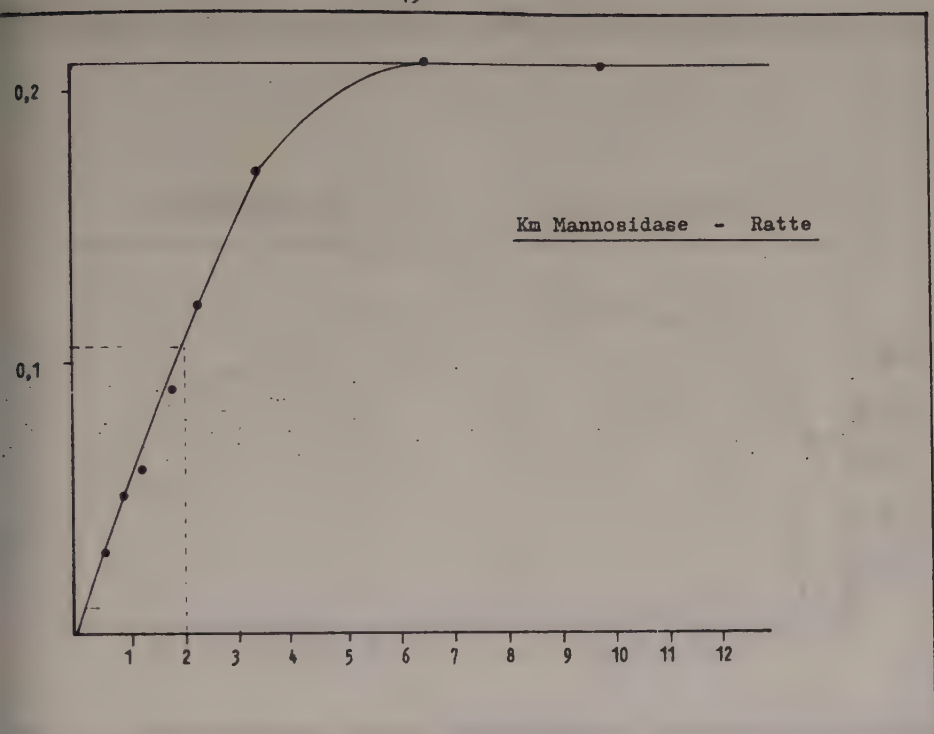
Km N-Acetyl-Glucosaminidase
- Ratte

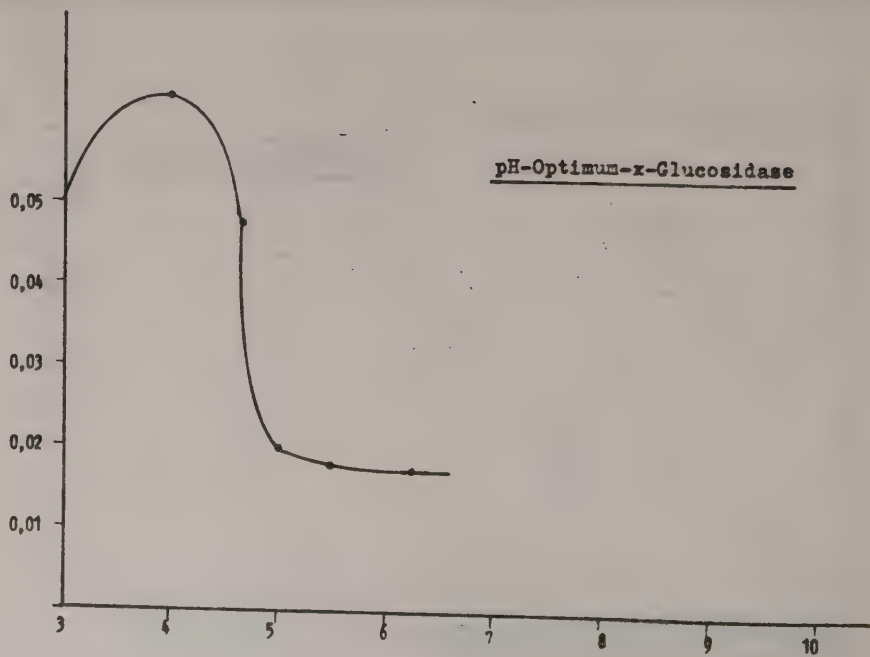
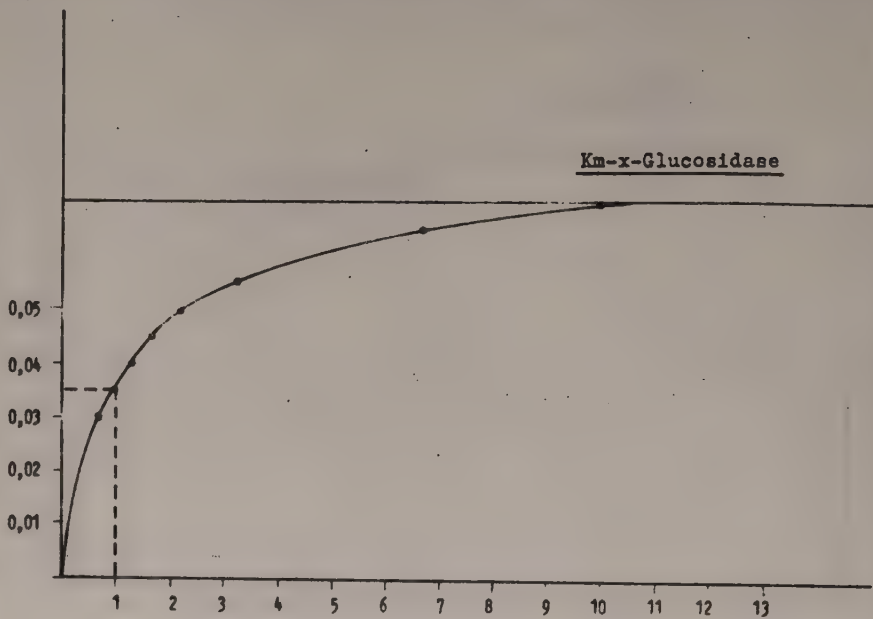


pH Optimum
N-Acetyl-Glucosaminidase
- Ratte

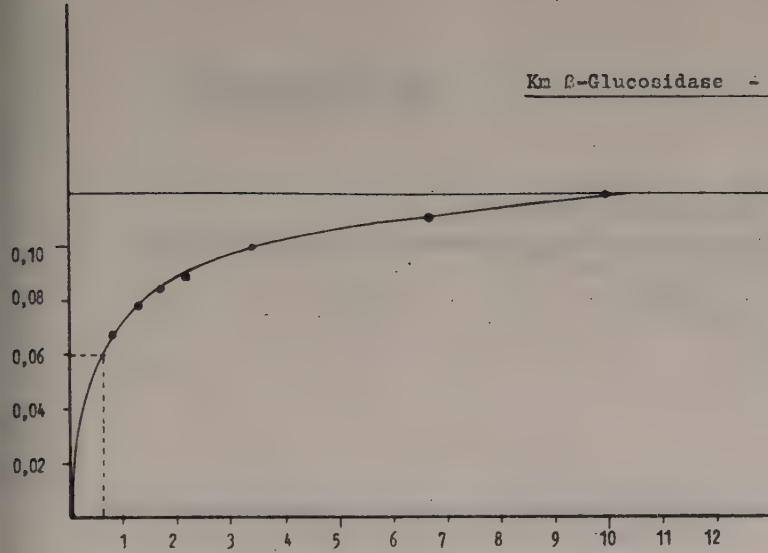


K_m-MannosidasepH-Optimum x-D-Mannosidase

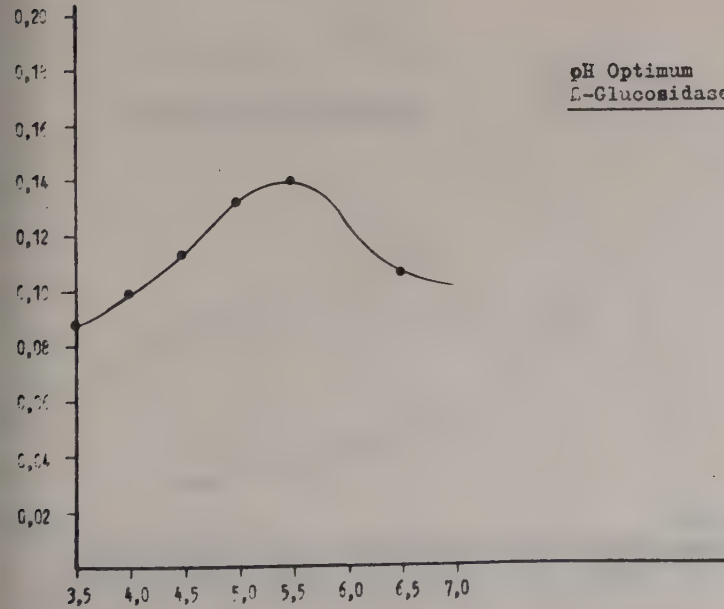


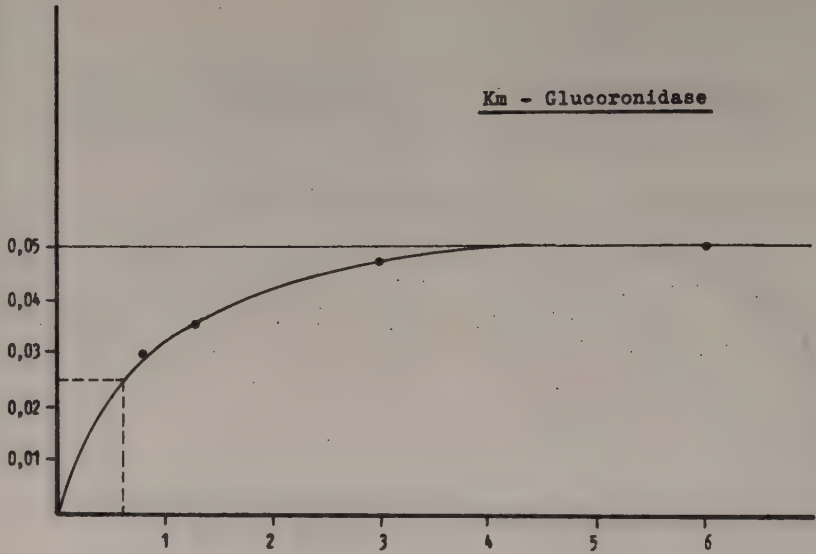
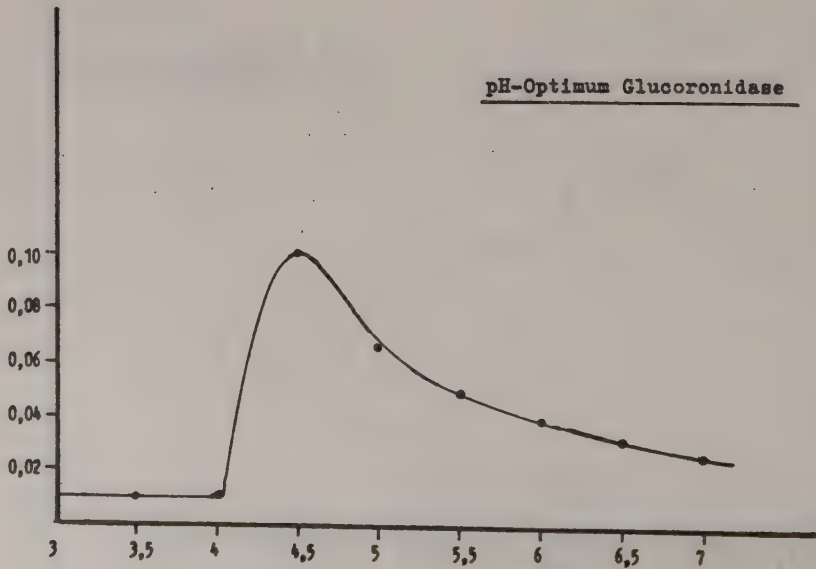


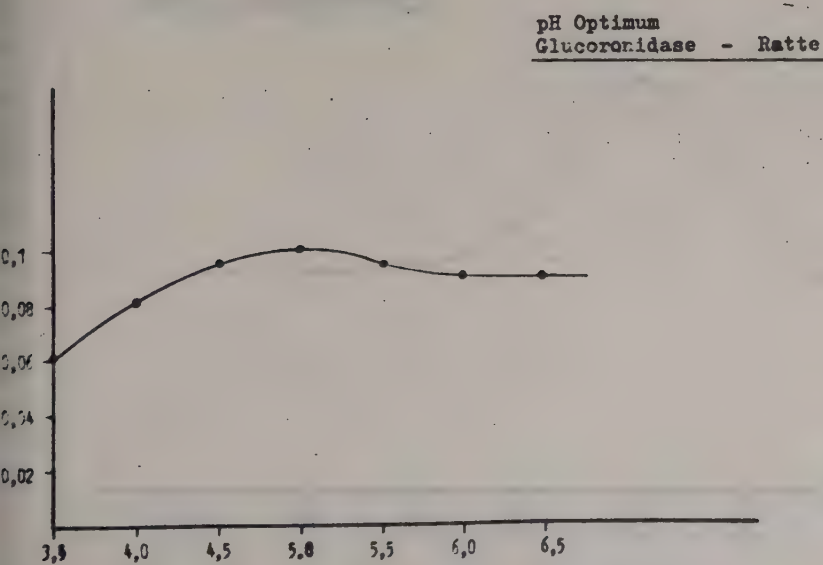
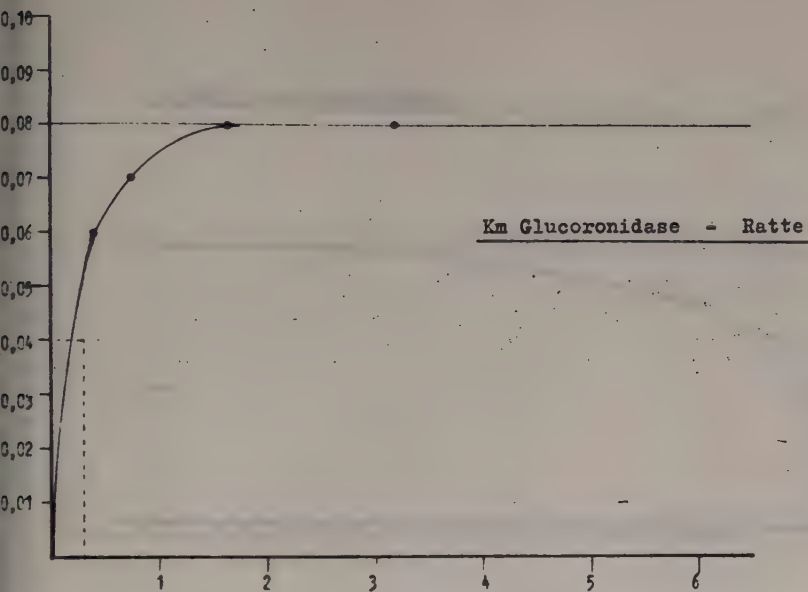
Km β -Glucosidase - Ratte



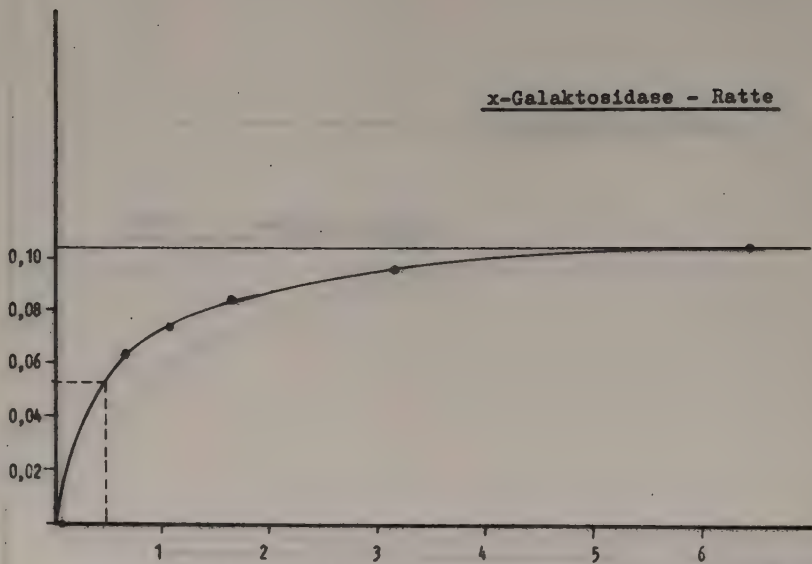
pH Optimum
 β -Glucosidase - Ratte



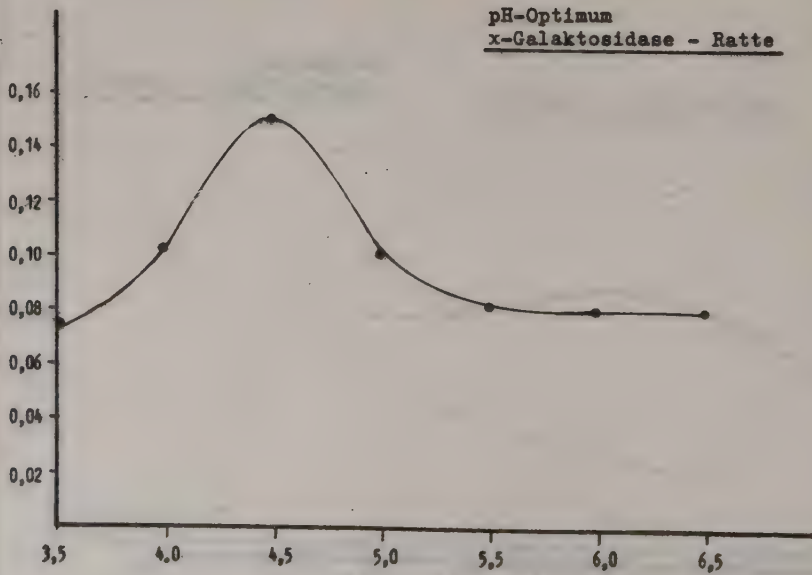
K_m - GlucoronidasepH-Optimum Glucoronidase



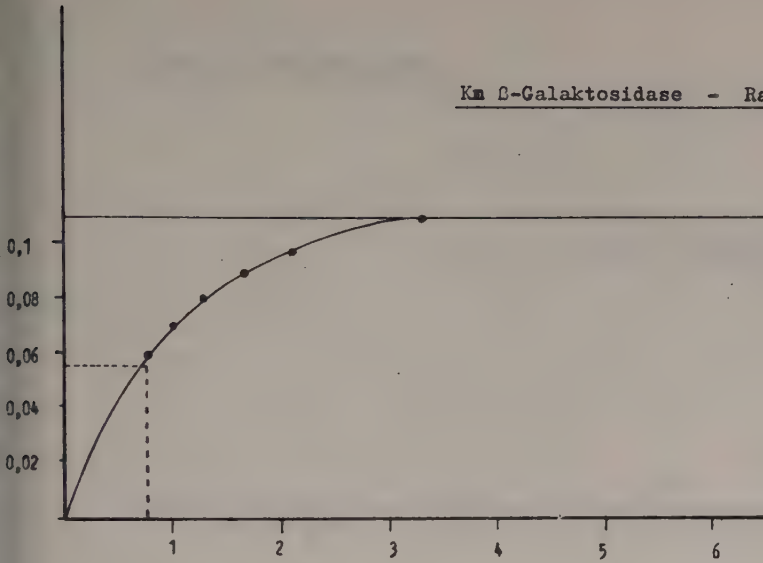
x-Galaktosidase - Ratte



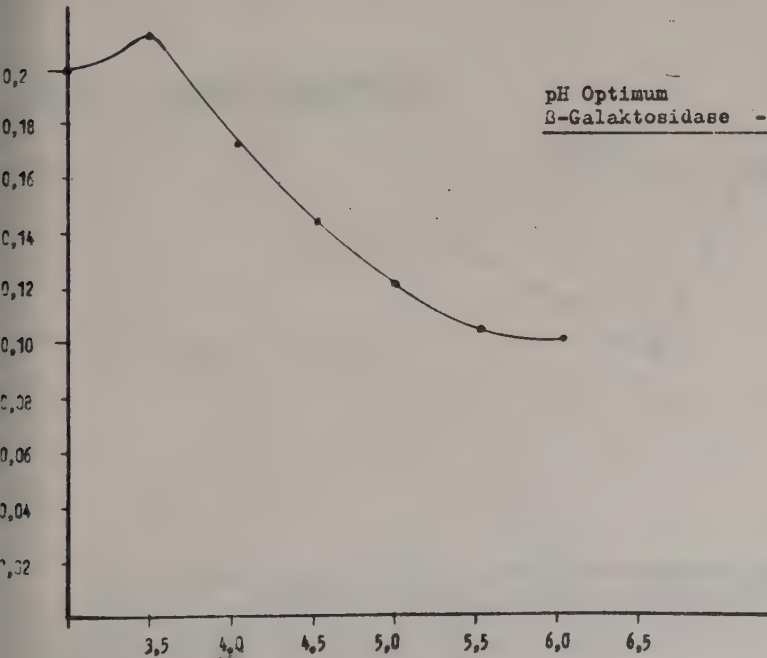
pH-Optimum
x-Galaktosidase - Ratte



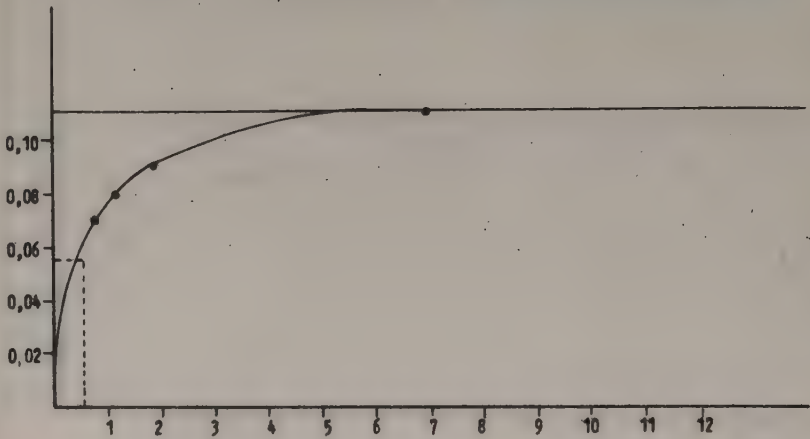
K_m β -Galaktosidase - Ratte



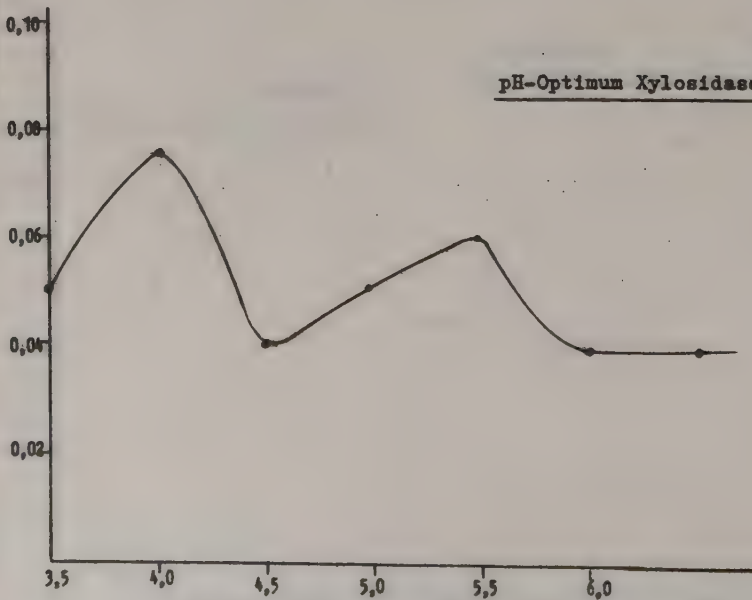
pH Optimum
 β -Galaktosidase - Ratte

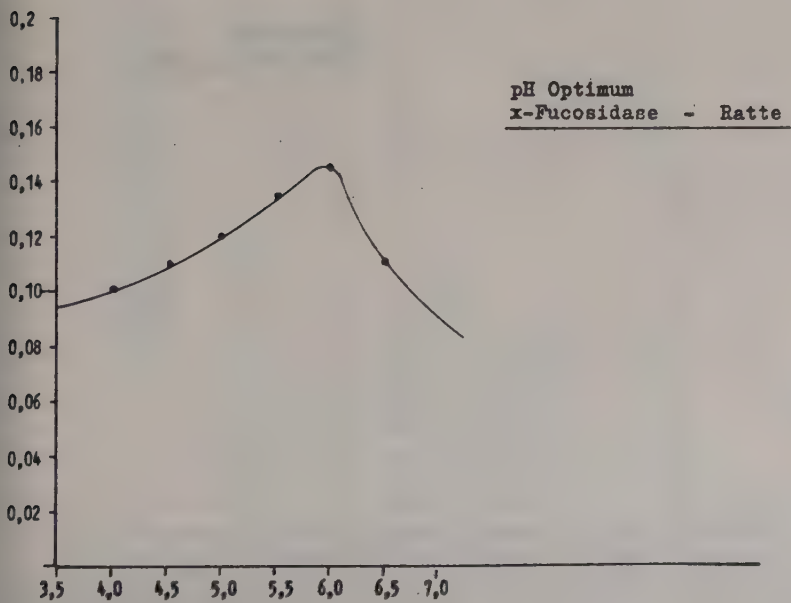
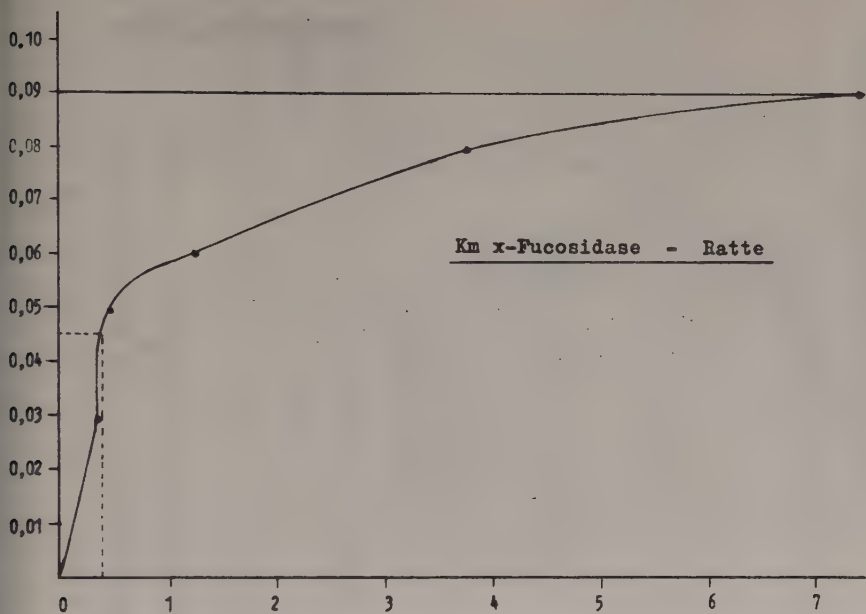


Km-Xylosidase - Ratte

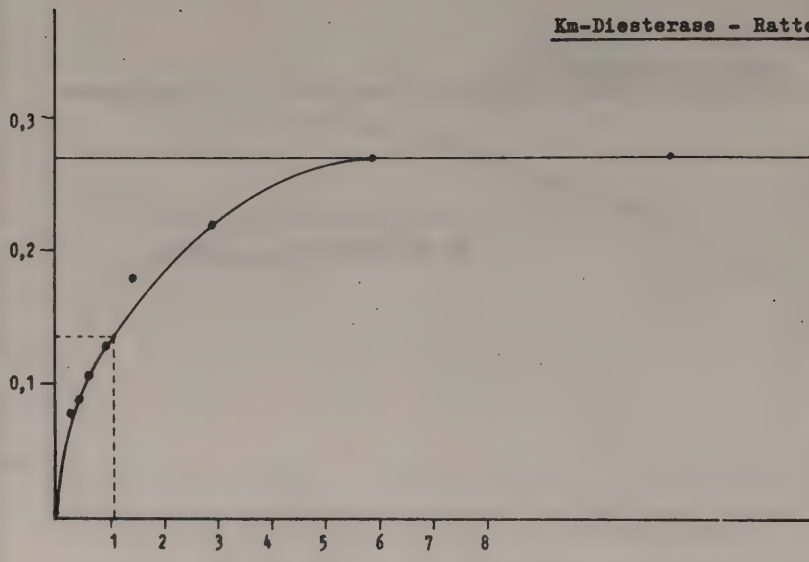


pH-Optimum Xylosidase - Ratte

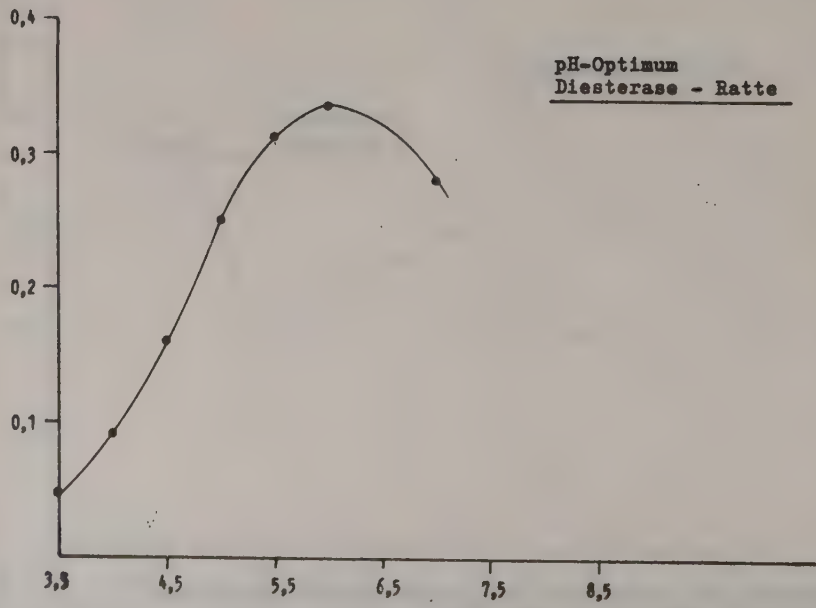




Km-Diesterase - Ratte



pH-Optimum
Diesterase - Ratte



III. 3.

pH-Optima und Michaelis-Konstanten verschiedener Hydrolasen in Lysosomen aus der Glandula submandibularis des Menschen

Enzym	pH-Optimum	kM	Substrat	Literatur
Saure Phosphatase	5,0; 6,0	$3,6 \cdot 10^{-3}$	4-Nitrophenylphosphat	2, 3, 4, 5, 16, 18
N-Acetylglucosaminidase	4,0	$0,8 \cdot 10^{-3}$	4-Nitrophenyl-N-Acetyl- β-D-glucosaminid	6
α-D-Mannosidase	4,5	$1,0 \cdot 10^{-3}$	4-Nitrophenyl-α-D-Mannosid *)	
α-D-Glucosidase	4,0	$1,0 \cdot 10^{-3}$	4-Nitrophenyl-α-D-Glucosid	2, 3, 4, 18, 7
β-D-Glucoronidase	4,5	$0,8 \cdot 10^{-3}$	4-Nitrophenyl-β-D-Glucoronid	

III. 3.

Spezifische Aktivität der sauren Phosphatase und einiger Glucosidasen in den
Lysosomenpräparaten aus 8 verschiedenen Glandula submandibularis des Menschen

Drüse	Saure Phosphatase	N-Acetyl-glucos- aminidase	Mannosidase	-Glucosidase	-Glucoronidase
1	5320	1020	510	790	266
2	4770	2120	535	895	269
3	3600	1000	325	320	125
4	5000	1300	525	450	250
5	6680	1300	537	565	202
6	7160	1700	471	915	237
7	7280	850	638	1030	850
8	5300	830	610	965	310

III. 4. pH-Optima und Michaelis-Konstanten verschiedener Hydrolasen in Lysosomen aus der Glandula submandibularis der Ratte

Enzym	pH-Optimum	kM	Substrat	Literatur
Saure Phosphatase	5,5	$1,0 \cdot 10^{-3}$	4-Nitrophenylphosphat	2, 3, 4, 5, 16, 18
N-Acetylglucosaminidase	4,5	$0,5 \cdot 10^{-3}$	4-Nitrophenyl-N-Acetyl- β-D-glucosaminid	6
α-D-Mannosidase	5,0	$2,0 \cdot 10^{-3}$	4-Nitrophenyl-α-D-Mannosid	
β-D-Xylosidase	4,0; 5,0	$0,5 \cdot 10^{-3}$	4-Nitrophenyl-β-D-Xylosid	10
α-L-Fucosidase	6,0	$0,4 \cdot 10^{-3}$	4-Nitrophenyl-α-L-Fucosid	11
β-D-Glucuronidase	5,0	$0,3 \cdot 10^{-3}$	4-Nitrophenyl-β-D-Glucoronid	8, 9
β-D-Glucosidase	5,5	$0,5 \cdot 10^{-3}$	4-Nitrophenyl-β-D-Glucosid	2, 3, 4, 7, 18
α-D-Galaktosidase	4,5	$0,5 \cdot 10^{-3}$	4-Nitrophenyl-α-D-Galaktosid	12
β-D-Galaktosidase	4,0	$0,7 \cdot 10^{-3}$	4-Nitrophenyl-β-D-Galaktosid	12
Diesterase	6,0	$1,1 \cdot 10^{-3}$	Bis(4-Nitrophenyl)-phosphat	13, 14, 15

III. 4. Spezifische Aktivität der sauren Phosphatase und einiger Glucosidasen in den Lysosomen aus
5 verschiedenen Glandula submandibularis der Ratte

Drüse	Saure Phospha-	N-Acetyl- glucos-	x-Manno- sidase	Di- esterase	β-Xylosi- dase I	β-Xylosi- dase II	x-Fucosi- dase	β-Glucu- ronidase	β-Glucu- sidase	x-Galak- tosidase	β-Galak- tosidase
1	5080	3020	3300	1875	565	445	445	326	460	326	760
2	4700	2900	2120	1950	580	500	500	470	500	390	860
3	4970	3380	2480	1820	875	545	545	675	545	545	685
4	3980	2980	2340	1690	750	469	690	595	496	469	705
5	2900	4200	1930	1120	360	330	330	345	338	345	470

III. 5. Eigenschaften der einzelnen Enzyme

Wie die Befunde zeigen, liegen die Relationen der einzelnen spezifischen Enzymaktivitäten bei den untersuchten Drüsen der gleichen Species in vergleichbaren Größenordnungen, d.h. die Verhältnisse der einzelnen Enzymaktivitäten zueinander sind bei gesunden Drüsen annähernd konstant.

Die lysosomale Lokalisation der sauren Phosphatase wurde von mehreren Autoren bestätigt, z.B. von de Duve et al. (1962).

Die biochemische Definition eines Lysosoms, daß es saure Phosphatase enthalten muß, schließt die Anwesenheit des Enzyms außerhalb der Lysosomen nicht aus (Neil und Horner 1964).

Wie im Kapitel III.2. beschrieben wurde, zeigte das in den Lysosomen der Submandibularis bei Mensch und Ratte nachgewiesene Enzym, daß es ähnliche Eigenschaften besitzt, wie die bisher isolierten Enzyme der anderen Mammaliengewebe. Das Enzym konnte bis zu 74 % seiner Aktivität mit 10 nmol Tartrat inhibiert werden. Fluorionen wirken bis zu 100 % hemmend auf das Enzym.

Die intralysosomale Lokalisation der β -Acetyl-Glucosaminidase wurde von Sellinger et al. (1960) nachgewiesen. In der Submandibularis zeigte das Enzym ähnliche pH-Optima und spaltete das spezifische Phenyl-Derivat.

Chonchie und Hay (1963) sowie Bowers und de Duve (1967) konnten die Existenz der α -D-Mannosidase in den Lysosomen verschiedener Gewebe demonstrieren. Die vorliegende Arbeit zeigte, daß die α -D-Mannosidase ebenfalls in den Lysosomen der Submandibularis vorkommt. Die Submandibularis- α -D-Mannosidase spaltet das spezifische Substrat 4-Nitrophenyl- α -D-Mannopyranosid. Da das Substrat im alkalischen Milieu schnell hydrolysiert wird, konnte der entsprechende Leerwert unmittelbar vor der Messung angesetzt werden.

De Duve et al. (1955) konnte die Existenz der β -Glucoronidase in den Lysosomen nachweisen. Mit p-Nitrophenyl- β -D-Glucoronid wurde die β -Glucoronidase in den Lysosomen der Glandula submandibularis von Mensch und Ratte nachgewiesen. Das pH-Optimum zeigte seine Aktivität bei der menschlichen Drüse bei 4,5; die ähnliche Aktivität der menschlichen Leber-Enzyme Musa et al. (1965) lag bei 4,3.

Die α -und β -Glucosidasen sowie die Galactosidasen, Xylosidase, Fucosidase und Diesterase der Glandula submandibularis von Mensch und Ratte, wie in Kapitel III.2. erwähnt, zeigten ähnliche Eigenschaften, wie bei anderen, früher untersuchten Gewebearten.

Das am häufigsten vorkommende Proteinase im tierischen Gewebe, das Cathepsin D, wurde wiederholt als lysosomales Enzym bestätigt. (Bowers und de Duve (1967)). Cathepsin D unterscheidet sich von den meisten Proteinasen dadurch, daß es Substrate mit niedrigem Molekulargewicht spaltet. Das am meisten verwendete Substrat ist Hämoglobin. Das in den Lysosomen der Submandibularis nachgewiesene Cathepsin D zeigte ähnliche Eigenschaften.

IV. Zusammenfassung

Seit Entdeckung und Definition der Lysosomen als intracelluläre Verdauungsorgane durch de Duve (1) wird ihre Bedeutung für die Physiologie und Pathophysiologie immer deutlicher. Die Lysosomen sind Zellorganellen, umgeben mit einer Lipidmembran, die mit einer Reihe von verschiedenen Hydrolasen mit saurem pH-Optimum ausgestattet sind. Physiologischerweise können durch Zusammenwirken dieser Enzyme funktionslos gewordene Strukturelemente oder Stoffwechselprodukte der Zellen wie Proteine, Polysaccharide, Lipide, Nucleinsäuren oder komplexe Verbindungen nach Aufnahme in die Lysosomen abgebaut werden. Die Hydrolyseprodukte stehen dann zur weiteren Metabolisierung dem Organismus zur Verfügung ("Zellmauserung"). Bei pathologischen Vorgängen verschiedener Genese kommt es immer durch Veränderungen oder durch Zerstörung der Lysosomenmembran zur Freisetzung solcher Enzyme aus dem Lysosomenverband. Die Folgen sind autolytische Prozesse. Das Auftreten lysosomaler Enzyme im Blutplasma läßt somit Rückschlüsse auf tiefgehende Zellschäden zu (klassisches Beispiel: saure Phosphatase bei Prostatacarcinom). Am eindrucksvollsten präsentiert sich die Bedeutung der lysosomalen Enzyme bei einer Reihe von genetisch bedingten Ausfällen bestimmter lysosomaler Enzyme. Verschiedene Erkrankungen des Zentralnervensystems, wie amnurotische Idiotie, morbus Faber, -Gaucher, -Fabry, sowie Glucogenose und Mannosidose der Leber sind dadurch gekennzeichnet, daß definierte lysosomale Enzyme in den Zellen dieser Gewebe nicht gebildet werden, wobei es zur Anhäufung spezieller Stoffwechselprodukte kommt. Die Funktionsfähigkeit der entsprechenden Zellen geht dabei verloren. Auch die Wirkung vieler Pharmaka kommt dadurch zustande, daß sie die Funktion des intracellulären Apparaten beeinflussen können (Cortison als Stabilisator, Vitamin A als labilisierendes Agens für die Lysosomenmembran).

Die bisher vorliegenden Ergebnisse wurden im wesentlichen an Lysosomen der Leber, der Niere, des lymphatischen- und Nervengewebes und an Lysosomen der weißen Blutzellen erarbeitet (1a). In der uns zugänglichen Literatur fehlen Untersuchungen über die Enzymausstattung der Lysosomen der Verdauungsdrüsen.

Im Gegensatz zum Pankreas fehlen bei den Speicheldrüsen des Kopfes weitgehend Enzyme wie Proteasen und Phospholipasen, die eine Isolierung von Lysosomen aus Gewebshomogenaten problematisch erscheinen lassen könnten.

Es war deshalb zunächst interessant, die Möglichkeit zur Isolierung von Lysosomen aus der Glandula submandibularis des Menschen und der Ratte als Versuchstier zu prüfen und die Enzymausstattung der angereicherten Lysosomen zu untersuchen und die Enzyme zu charakterisieren.

Wie die Befunde zeigen, liegen die Relationen der einzelnen spezifischen Enzymaktivitäten bei den untersuchten Drüsen der gleichen Species in vergleichbaren Größenordnungen, d.h. die Verhältnisse der einzelnen Enzymaktivitäten zueinander sind bei gesunden Drüsen annähernd konstant. Es erscheint daher möglich, durch Untersuchung der lysosomalen Enzymmuster bei pathologisch veränderten Speicheldrüsen unklarer Genese Zusammenhänge zwischen lysosomaler Leistung und Erkrankung zu finden, im Sinn der einführend skizzierten Fälle. Wir denken hierbei vor allem an nichtentzündliche Sialosen, wie sie als sog. Stoffwechselkrankheiten der Speicheldrüse zusammengefaßt werden. Häufig kommt es bei diesen Erkrankungen zur Ablagerung von mucoiden, hylinen oder fibrinoiden Substanzen, was an lysosomale Dysfunktionen mit vermindertem Abbau solcher Substanzen denken läßt. Wenn es möglich ist, die Ursache einzelner Erkrankungen auf Störungen im lysosomalen Apparat zurückzuführen, könnte dies therapeutische Maßnahmen erleichtern.

Eine weitere Möglichkeit zur Anwendung der Ergebnisse sehen wir darin, daß es nach Isolierung und Charakterisierung gelöster lysosomaler Enzyme möglich sein dürfte, durch chemische oder immunologische Methoden im Blutserum speicheldrüsen-spezifische Lysosomenenzyme nachzuweisen. Im Einzelfall könnten bei diesem Vorgehen entzündliche Erkrankungen der Speicheldrüsen frühzeitig nachweisbar werden. Erste Untersuchungen in dieser Richtung scheinen unser Konzept zu bestätigen.

V. Literatur

1. Berthet, I., de Cuve, C.:
Biochem. J. 50, 174 (1951).
- 1.a Lysosomes in biology and pathology, Bd. I u. II
Edited by J.T. Dingle and H.B. Fell. Amsterdam-Londen:
North-Holland Publ. Comp. 1969.
2. Kezdy, F.J., Bembder, M.L.:
Biochemistry 1, 1097 (1962).
3. Kirsch, K.:
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 122, 265 (1966).
4. Faller, L., Sturtevon, J.M.:
J. biol. Chem. 241, 4825 (1966).
5. Dryer, R.L., Tames, A.R., Routh, J.I.:
J. biol. Chem. 225, 177 (1957).
6. Baruah, J., Leaback, J.D., Walter, P.G.:
Biochem. J. 78, 106 (1961).
7. Halvorson, H., Ellias, L.:
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 30, 28 (1958).
8. Kato, K., Yoshida, K., Tsukamoto, H., Nobunaga, M.,
Masuya, T., Sawada, T.:
Chem. Pharmaceut. Bull. 8, 239 (1960).
9. Szasz, G.:
Clin. chim. Acta 15, 275 (1967).
10. Fischer, D., Higham, M., Kent, P.W., Protchard, P.:
Biochem. J. 98, 46 P (1966).
11. Levy, G.A., Mc Allen, A.:
Biochem. J. 80, 425 (1961).
12. Huggins, C., Lapidus, S.:
J. biol. Chem. 170, 467 (1947).
13. Sinsheimer, R.L., Koerner, J.F.:
J. biol. Chem. 198, 293 (1952).
14. Holbrook, J., Ortanderl, F., Pfeleiderer, G.:
Biochem. Z. 345, 427 (1966).
15. Fiers, W., Khorana, M.G.:
J. biol. Chem. 238, 2780 (1963).
16. Linhardt, K., Walter, K.:
Methoden der enzymatischen Analyse, Hrsg. H.U. Bergmeyer,
Weinheim/Bergstr.: Verlag Chemie 1962.

17. Wallenfels, K., Diekmann, H.:
Hoppe-Seyler/Tierfelder, Handbuch der Physiologisch-
und Pathologisch-Chemischen Analyse, 10. Aufl., Bd. IV B,
Berlin-Heidelberg-New York: Springer(1966).
18. Hillmann, G.:
Methoden der enzymatischen Analyse, Hrg. H.U. Bergmeyer.
Bd. I, S. 889, Weinheim/Bergstr.: Verlag Chemie(1970).
19. Sandritter, Beneke:
Allgemeine Pathologie, Schattauer Verlag, (1974)
20. Zollinger:
Allgemeine Pathologie, Bd. I,
Gg. Thieme Verlag(1972)
21. J. F. Tallman et al:
J. of Neurochemistry, (1971), Vol. 18, 1775.
22. Heißmeyer, Stein, Strasser:
"Blut", Bd. XXIII, 228-232, (1971).
23. Isenberg, Stjernholm:
J. of Reticuloendothelial Soc., Vol. 9, No. 6, (1971).
24. Bernard, Serou, Aldrete and Schultz:
Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., Vol. 137, No. 4, (Sept. 1971),
1389.
25. Öckerman:
The Journal of Pediatrics, Vol. 75, No. 3, P. 360-365,
(Sept. 1969).
26. Ostrowski, Tsugita
Archives of Biochemistry and Biophysics, P. 94, 68-78 (1961).
27. de Duve, Wattiau:
Ann. Rev. Physiol. 28, 435 (1966).
28. Allison, Mallucit, Lancet:
(1964), II., 1371 - 1373.
29. de Duve, C.:
Harvey Lectures, 59, 49 (1965).
30. de Duve, C., Baudhuin:
Physiol. Rev. 46, 323 (1966).
31. de Duve, C. and J. Berthet:
Intern. Rev. Cytol., 3, 225 (1954).
32. de Duve, C., J. Berthet, L. Berthet, F. Appelmans:
Nature, 167, 889, (1951).
33. Novikoff, A.B., H. Beaufay, C. de Duve:
Biophys. Biochem. Cytol., 2 Suppl. 1979 (1956).

34. Novikoff, A.B., E.Podber, J.Ryan and E.Noel:
J. Histochem. Cytochem., 1., 27, (1953).
35. Barrett, A.J.:
Nature (Lond.), 211, 1188, (1966).
36. Barrett, A.J.:
Biochem. J., 104, 601 (1967).
37. Beaufay, H., D.S. Bendall, P.Baudhuin and C.de Duve:
Biochem. J., 73, 623 (1959).
38. Bowers, W.E. and C. de Duve:
J. Cell. Biol., 32, 339 (1967a).
39. Brightwell, R. and A.L. Tappel:
Arch. Biochem. Biophys., 124, 325, (1968a).
40. Cohn, Z.A. and J.G. Hirsch:
J. Exptl. Med., 112, 983, (1960).
41. Iodice, A.A.:
Arch. Biochem. Biophys., 121, 241, (1967).
42. K.Hochstraßer und S.Haddad:
Die Enzymausstattung der Lysosomen aus der Glandula
submandibularis des Menschen und der Ratte
Arch.klin. exp. Ohr-, Nas.- u. Kehlk.Heilk. 203, 41-47
(1972).

Am 4.10.1941 wurde ich, Sami Haddad, als Sohn des Architekten Dib Haddad und seiner Ehefrau Malakie in Kab Elias, Libanon, geboren.

Die Vorschule absolvierte ich in Kab Elias; anschließend besuchte ich das Universal College in Aley, wo ich 1958 das Abitur erfolgreich bestand.

1967 begann ich an der Universität München das Studium der Tiermedizin. 1968 legte ich das Vorphysikum ab.

1969 begann ich, ebenfalls an der Universität München, das Medizinstudium, absolvierte 1970 das Physikum und bestand am 17.9.1973 das medizinische Staatsexamen mit der Note "gut".

Vom 1.1.1974 bis 31.5.1974 war ich als Medizinalassistent in der Privatklinik Dr. Maul in Ingolstadt tätig.

Seit dem 1.6.1974 arbeite ich als Medizinalassistent im Kreiskrankenhaus Kösching.

Seit 31. Dezember 1974 bin ich als Assistenzarzt an der Chirurgischen Abteilung des gleichen Hauses tätig.

Herrn Priv. Doz. Dr. K. Hochstraßer möchte ich an dieser Stelle für die Überlassung des Themas der vorliegenden Arbeit sowie für seinen fachlichen Rat und die vielfältigen Anregungen bei der Durchführung dieser Arbeit herzlich danken.

Desgleichen gilt mein Dank dem Dekan der Medizinischen Fakultät der Universität München, Herrn Prof. Dr. W. Spann, Direktor des Gerichtsmedizinischen Institutes der Universität, für die Überlassung der Submandibularis-Drüsen.

Danken möchte ich ferner dem Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

